

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Parasitología



**LEISHMANIOSIS VISCERAL EN EL CRICETO  
DORADO: VALORACION DE NUEVAS  
FORMULACIONES DE ANFOTERICINA B**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Sara Rama Íñiguez

Bajo la dirección del Doctor:

Francisco Bolás Fernández

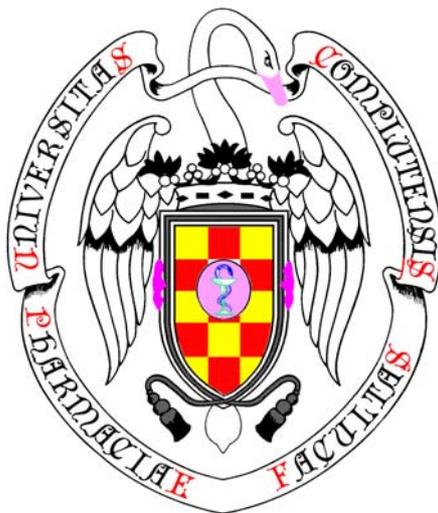
**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2518-X**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**



**LEISHMANIOSIS VISCERAL EN EL CRICETO DORADO:**

**VALORACION DE NUEVAS FORMULACIONES DE**

**ANFOTERICINA B**

**TESIS DOCTORAL**

**SARA RAMA IÑIGUEZ**

**Madrid, 2004**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**



**LEISHMANIOSIS VISCERAL EN EL CRICETO DORADO:**

**VALORACION DE NUEVAS FORMULACIONES DE**

**ANFOTERICINA B**

Memoria presentada por **Sara Rama Iñiguez**  
para optar al grado de Doctor

Director: **D. Francisco Bolás Fernández**

**D. FRANCISCO BOLAS FERNANDEZ**, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de investigación titulado: **Leishmaniosis visceral en el criceto dorado: valoración de nuevas formulaciones de anfotericina B**, presentado por la Licenciada en Farmacia, **Sara Rama Iñiguez**, ha sido realizado bajo su dirección, en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, cumpliendo los requisitos exigidos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

VºBº

El Director del Departamento

Madrid, de

de 2004

**Prof. Antonio R. Martínez Fernández**

**Prof. Francisco Bolás Fernández**

***A mis padres***

***A Tito***

## **AGRADECIMIENTOS:**

*En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Francisco Bolás Fernández, director de esta Tesis Doctoral, por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación ofreciéndome la posibilidad de desarrollar este trabajo, por sus consejos, su ayuda y su paciencia sobre todo en la última etapa de la parte experimental de la Tesis.*

*También quiero darle las gracias al Prof. Antonio Ramón Martínez Fernández, Catedrático de Parasitología y Director de este Departamento, por haberme facilitado sus instalaciones y equipos y por su continuo respaldo.*

*A la Dra. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea Ayuela porque sin su ayuda esta Tesis no habría sido posible. La verdad es que podría llenar muchas hojas agradeciéndole a Maruxi todo lo que ha hecho por mí, pero desafortunadamente tengo que ser breve. Quisiera destacar su tesón y su empeño en que las cosas salgan adelante y aunque me ha hecho trabajar a un ritmo muy fuerte durante estos años, los frutos de tanto esfuerzo están aquí en forma de Tesis. Ella me ha ayudado mucho a nivel profesional y personal y siempre ha estado ahí en los momentos buenos y no tan buenos, sin importarle trabajar cualquier día del año y a cualquier hora.*

*Al Prof. Juan José Torrado Durán y al Dr. José Antonio Sánchez Brunete, colaboradores del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica de esta Facultad, por su ayuda y consejos y porque sin sus formulaciones galénicas esta Tesis tampoco habría sido posible.*

*Al Prof. José María Alunda, Catedrático del Departamento de Patología Animal I de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por confiar en nosotros, por sus consejos científicos y por conseguir la financiación necesaria para la realización de los proyectos de investigación.*

*A todos los Profesores del Departamento de Parasitología: Carmen Cuéllar, Mercedes Martínez, Paco Ponce, Carmen Cuesta, Alicia Gómez, Catalina Castaño, Angel Sánchez, José Luis Zapatero, José Antonio Escario y José Luis Guillén por sus consejos y ayuda.*

*A mis compañer@s durante todos estos años: Marta, Sonia, Gonzalo, Chus, Patricia, Ana, Susana, Juan José Nogal, Sara Bejarano, David, Carlos, Flery, Miriam, Celeste, Matthew, Sergio, Sara Palacios, Carlota, Juan José García, Kennedy y Carolina por haberme ofrecido su apoyo y ayuda siempre, y por las risas compartidas.*

*A Javier, Inés, Piedad, Antonio y Judith porque ellos contribuyen al día a día del departamento, en especial a Javier por estar siempre ahí para escucharme.*

*A los compañer@s del Departamento de Patología Animal I de la Facultad de Veterinaria: M<sup>a</sup> Teresa, Susana, Fran, Salceda, Francisco, Nacho, Israel, Lara, Pablo y Álvaro por su colaboración.*

*A los Dres. José María Requena y Carlos Alonso de la Universidad Autónoma de Madrid por proporcionarnos la cepa de Leishmania infantum con la que se ha realizado esta tesis.*

*A la Profa. Joaquina Martín Sánchez de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada por compartir con nosotros sus conocimientos sobre PCR-ELISA y por su gran amabilidad.*

*A la Dra. Ana Canals, Directora del CISA, por permitirnos utilizar sus aparatos e instalaciones para los ensayos de linfoproliferación in vitro.*

*A los compañer@s del Departamento de Microbiología II de esta Facultad: Aída, Marta, Isabel, Víctor, Carmina, José, María Molina y Concha Gil, por su ayuda sobre todo en los estudios de Biología Molecular.*

*A todas aquellas personas que han contribuido directa o indirectamente a la realización de este trabajo, en especial al personal de los Centros de Ayuda a la Investigación, por sus consejos científicos.*

*A mi familia y amig@s, sobre todo a mis padres por creer siempre en mi, apoyarme en mis decisiones y animarme a continuar mi formación.*

*A Tito, por escucharme siempre que lo necesito, por darme ánimos, por su paciencia y sobre todo por su cariño.*

*Por último, aunque no menos importante, a todos los animales que han perdido la vida en beneficio de este trabajo.*

\* Esta Tesis Doctoral la he realizado becada por el Ministerio de Educación Cultura y Deporte (Beca de Formación de Profesorado Universitario: FPU).

\* Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación: AGF 98-0731, AGL 2001-1295-C03-01, AGL 2002-02175GAN (M.C.Y.T, Dirección General de Investigación).

# INDICE.

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Revisión Bibliográfica</b>	<b>7</b>
1. Introducción	7
1.1. Filogenia y clasificación taxonómica	8
1.2. Morfología	10
1.3. Ciclo biológico	12
1.4. Diversidad clínica	14
2. Respuesta inmune	18
2.1. Generalidades	18
2.2. Modelos experimentales y respuesta inmune	21
2.2.1. Modelos <i>in vitro</i>	21
2.2.2. Modelos <i>in vivo</i>	25
2.2.2.1. Modelo murino	25
2.2.2.1.1. Modelo murino de leishmaniosis cutánea	25
2.2.2.1.2. Modelo murino de leishmaniosis visceral	27
2.2.2.2. Modelo en criceto	29
2.2.2.3. Modelo canino	35
3. Anfotericina B y sus formulaciones	38
3.1. Eficacia de la anfotericina B	39
3.1.1. Eficacia en humanos	40
3.1.2. Eficacia en perros	44
3.1.3. Eficacia en ratones	46
3.1.4. Eficacia en cricetos	49
3.2. Toxicidad	50
3.3. Farmacocinética	51
3.4. Efecto inmunomodulador	52
<b>Objetivos</b>	<b>55</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>57</b>
1. Animales de experimentación	57
2. Cepas de <i>Leishmania</i>	57
3. Cultivo y recuento de promastigotes para infección	58
4. Infecciones experimentales	58
5. Principio activo y polímeros empleados en las distintas formulaciones galénicas ensayadas	59
6. Reactivos generales	60

7. Reactivos para ELISA	61
8. Reactivos para Electroforesis de proteínas	62
9. Reactivos para Western-blot	63
10. Reactivos para Citometría de flujo	64
11. Reactivos para la determinación de inmunocomplejos en riñón	65
12. Reactivos para PCR	65
13. Medios de cultivo	66
14. Pesos de los animales y de los órganos	67
15. Obtención de amastigotes de tejidos y transformación a promastigotes	68
16. Determinación de la carga parasitaria en bazo e hígado	68
17. Obtención del antígeno (extracto bruto salino)	69
18. Valoración de proteínas por el método Bradford	69
19. Obtención de sueros	70
20. Determinación de los niveles de anticuerpos	70
21. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SD-PAGE)	71
22. Detección de antígenos por Western-blot	73
23. Obtención de linfocitos esplénicos	74
24. Determinación de subpoblaciones linfocitarias mediante Citometría de flujo	74
25. Ensayos de Linfoproliferación <i>in vitro</i>	75
26. Determinación de inmunocomplejos en riñón de criceto	75
27. Determinación de la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos de criceto mediante una RT-PCR cuantitativa a tiempo real	76
28. Determinación de la carga parasitaria en bazo e hígado de criceto mediante una PCR cuantitativa a tiempo real	78
29. Determinación de los niveles de transaminasas en suero	79
30. Ensayos de toxicidad agua	79
31. Análisis estadístico	80
<b>Resultados</b>	<b>81</b>
1. Elección del modelo experimental y de la dosis de infección	81
1.1. Modelo experimental en criceto dorado	81
1.2. Modelo experimental en ratones Balb/c	93
2. Tratamiento en la fase temprana (asintomática) de la infección, con anfotericina B libre y formulada en microesferas de HSA, a la dosis de 1 mg/Kg/día	103
2.1. Resultados a día 32 p.i.	104
2.2. Resultados a día 135 p.i.	109
2.3. Efecto de las microesferas de HSA vacías	118

3. Tratamiento en el periodo sintomático con anfotericina B formulada en HSA, a la dosis de 2 mg/Kg/día. Estudio de los estados de agregación	125
4. Estudios de toxicidad aguda	139
5. Tratamiento en el periodo sintomático con anfotericina B poliagregada formulada en HSA, a la dosis de 40 mg/Kg/día	143
6. Tratamiento en el periodo sintomático con anfotericina B poliagregada libre y formulada en HSA, a las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día	155
7. Efecto de la anfotericina B poliagregada formulada en HSA, sobre la población CD4+ esplénica en cricetos sanos	169
8. Tratamiento en el periodo sintomático con anfotericina B poliagregada, formulada en Acido Poliláctico-co-Glicólico. Comparación con Fungizona®	171
9. Puesta a punto de una técnica de PCR cuantitativa a tiempo real para la determinación de citoquinas y carga parasitaria en criceto	177
9.1. Determinación de citoquinas	177
9.1.1. Medida de la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos, correspondiente a la puesta a punto del modelo experimental en criceto	184
9.1.2. Medida de la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos de cricetos infectados y tratados con la anfotericina B	188
9.1.3. Medida de la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos de cricetos no infectados y tratados con anfotericina B	191
9.2. Determinación de la carga parasitaria en bazo e hígado	194
<b>Discusión</b>	199
1. Modelo de leishmaniosis visceral en ratones Balb/c	199
2. Modelo de leishmaniosis visceral en cricetos	204
3. Efecto del tratamiento sobre la carga parasitaria: eficacia de las nuevas formulaciones	209
4. Efecto del tratamiento sobre la respuesta inmune	218
4.1. Respuesta inmune humoral	218
4.2. Respuesta inmune celular	223
5. PCR cuantitativa a tiempo real	236
<b>Conclusiones</b>	241
<b>Bibliografía</b>	243

# ***Abreviaturas***

## ABREVIATURAS.

- BSA:** Bovine Seric Albumin (Albúmina Sérica Bovina)  
**CS:** Control Sano  
**Ct:** Ciclo de amplificación en PCR cuantitativa  
**D.O.:** Densidad Óptica  
**DNP:** Dinitrofenilhidrazina  
**EDTA:** Acido Etilendiaminotetracético  
**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
**GOT:** Glutámico-Oxalacético-Transaminasa  
**GPT:** Glutámico-Pirúvico-Transaminasa  
**HPRT:** Hipoxantina fosforribosiltransferasa  
**HRPO:** Horse Radish Peroxidase  
**HSA:** Human Seric Albumin (Albúmina Sérica Humana)  
**IE:** Índice de Estimulación  
**OPD:** O-fenileno-diamina  
**PAGE:** Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PE:** Ficoeritrina  
**PLGA:** Polilactic-co-Glicolic Acid (Acido Poliláctico-co-Glicólico)  
**RT:** Retro-Transcripción  
**SBF:** Suero Bovino Fetal  
**SDS:** Sodium Dodecyl Sulphate  
**TAE:** Tampón Tris-Acético  
**TCR:** Receptor de células T  
**TEMED:** N,N,N',N'-Tetrametil-Etilendiamina

# ***Introducción***

## **INTRODUCCION.**

Para la especie humana, sus microorganismos patógenos y demás parásitos forman parte inseparable de su historia. Desde tiempo inmemorial, el curso de la humanidad se ha visto influido y hasta modificado por epidemias de enfermedades infecciosas. Algunas de estas enfermedades todavía hoy representan una grave amenaza. Pobreza, desnutrición, malas o pobres condiciones higiénicas, el aumento de la urbanización, las migraciones, los movimientos sociales, las guerras, los millones de refugiados, etc, son causas o factores que explican, no solo el aumento de ciertas enfermedades infecciosas, sino también su resurgir. Protozoos parásitos de gran importancia médica son los causantes de malaria, tripanosomiosis, leishmaniosis, amebiosis, toxoplasmosis y giardiosis.

Una de estas enfermedades, la leishmaniosis, origina importantes problemas de salud pública y los esfuerzos que se están haciendo para combatirla son aún insuficientes. Alrededor de 12 millones de personas sufren leishmaniosis en todo el mundo, amenazando a 350 millones de mujeres, hombres y niños en 88 países del mundo, 72 de los cuales se encuentran en vías de desarrollo (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>). La amplia diversidad tanto de las formas clínicas de dichas enfermedades, como de las situaciones epidemiológicas, obliga a aplicar en cada foco principios y métodos de lucha específicos. Además, la lucha contra las leishmaniosis suele estar obstaculizada por la ignorancia de la verdadera prevalencia de estas enfermedades y por la subestimación de los sufrimientos e incapacidades que causan. Existe una gran preocupación ante la creciente propagación de las leishmaniosis en el mundo. El kala-azar, si no se trata, tiene una tasa de mortalidad elevada. Las formas mucocutáneas del Nuevo Mundo son mutilantes y difíciles de tratar, mientras que el desfiguramiento producido por las formas cutáneas tiene un impacto psicológico permanente. Conviene hacer especial hincapié en el riesgo que estas enfermedades presentan para la salud de los niños, ya que este grupo de edad es más vulnerable y en él son más probables los fallos en el diagnóstico.

Desde hace 10 años las regiones endémicas se han extendido y ha habido un incremento marcado en el número de casos registrados. Esto está relacionado con el desarrollo económico y con cambios ambientales y de comportamiento que

## **Introducción**

incrementan la exposición a los vectores, como por ejemplo nuevos asentamientos, intrusión en bosques primarios, deforestación, migración masiva de zonas rurales a zonas urbanas, urbanización rápida, nuevos esquemas de irrigación, etc. Con frecuencia creciente se registran casos de turistas que visitan zonas endémicas y regresan a sus países infectados. Entre la población de la zona endémica, el riesgo permanente de epidemia alimenta un miedo constante. Más recientemente, la superposición de leishmaniosis visceral y SIDA ha desembocado en una nueva entidad re-emergente: la co-infección *Leishmania*/VIH. En Europa, donde entre el 25% y el 70% de los casos adultos de leishmaniosis visceral están relacionados con el VIH, los drogadictos por vía intravenosa han sido identificados como la mayor población de riesgo. Factores de riesgo individual como la malnutrición y la inmunosupresión juegan también un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>).

En la infección parasitaria, al igual que en la viral o en la bacteriana, el organismo utiliza sus mecanismos de defensa para impedir tanto el establecimiento como la multiplicación de los parásitos, y trata de eliminarlos del cuerpo. A su vez, los parásitos evolucionan también, procurando escapar de estas defensas, sobrevivir y multiplicarse en el organismo que los hospeda. La investigación en leishmaniosis, a pesar de experimentar un incremento lento pero sostenido durante los años posteriores a la Segunda Guerra Mundial, sufrió de una ausencia de reconocimiento y por lo tanto de financiación. Pero afortunadamente, en los últimos 30 años el número de investigaciones y publicaciones en todos los aspectos de *Leishmania* y las leishmaniosis han ido creciendo exponencialmente.

En la cuenca mediterránea la enfermedad es producida por la especie *Leishmania infantum*. Si bien en el hombre, la infección tiene un carácter oportunista, emergiendo en aquellos casos de severa inmunodepresión, en el perro la enfermedad se manifiesta de forma mucho más agresiva, planteando un serio problema de salud pública

Se calcula que unos 250.000 perros podrían estar infectados en España, de ellos unos 15.000 se ubican en la Comunidad de Madrid, lo que supondría alrededor del 5,5% del censo canino. Esta cifra se incrementa hasta 9,1%-11,1% en las encuestas de seroprevalencia en perros vagabundos, llegando hasta el 30% en

muestras de clínicas veterinarias, según datos de la Comunidad de Madrid a través del Programa de Vigilancia y Control de la leishmaniosis.

Las terapias comúnmente empleadas consiguen mejoras clínicas temporales y cambios en los parámetros inmunológicos. Sin embargo, el tratamiento normalmente no impide las recidivas, ni elimina al parásito totalmente. Debido a la inexistencia de una terapia efectiva para la leishmaniosis canina, nuevos fármacos, sistemas de liberación y estrategias de tratamiento son necesarias para conseguir una cura parasitológica consistente en perros. Por ello, sin abandonar otras estrategias de control, tales como el diseño de vacunas y la lucha contra los vectores, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos sistemas terapéuticos que garanticen una curación total y minimicen los efectos secundarios.

Los perros consituyen un excelente modelo para estudiar la leishmaniosis ya que actúan como pacientes, dianas para el control y un buen modelo para la leishmaniosis humana porque los síntomas en el perro son similares a los desarrollados en humanos (Peters y Killick-Kendrick, 1987). Sin embargo, la dificultad para manejarlos hace a este modelo inapropiado para estudios en los que se requiera gran número de animales, por ejemplo durante los test de protección.

Por todo ello, en el presente trabajo hemos empleado el criceto dorado como modelo de leishmaniosis visceral para la búsqueda de nuevos sistemas terapéuticos frente a esta enfermedad, ya que los parámetros clínicos e histopatológicos observados en dicho modelo son altamente coincidentes con los encontrados en el perro (Pearson y Queiroz-Sousa, 1996; Nieto y cols., 1999; Requena y cols., 2000).

# ***Revisión Bibliográfica***

## REVISION BIBLIOGRAFICA.

### 1. INTRODUCCION.

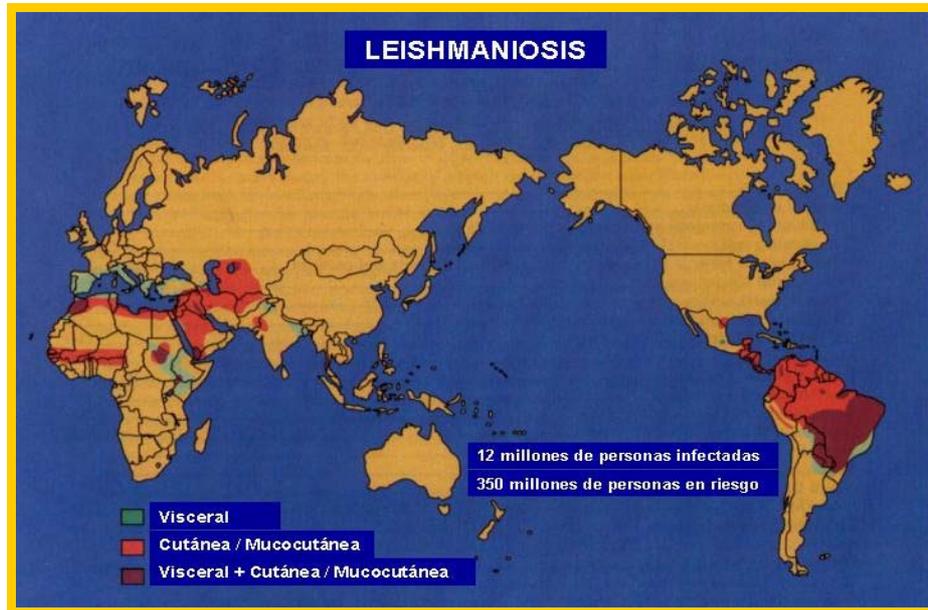
En 1903, William Boog Leishman y Charles Donovan, por separado, describieron al protozoo ahora denominado *Leishmania donovani*, en tejido esplénico de pacientes de la India con fiebre Dum-Dum o Kala-azar (Leishman, 1903; Donovan, 1903), enfermedad ahora denominada leishmaniosis visceral. Al mismo tiempo, Ronald Ross describió con más detalle, con el nombre de cuerpos de Leishman-Donovan, los amastigotes del protozoo *Leishmania* (Ross, 1903).

Con el paso del tiempo se fue comprobando que algunas enfermedades existentes en otras áreas de diferentes continentes, se correspondían con la leishmaniosis. Por ejemplo, los autores de la época no tardaron en diferenciar el agente infeccioso responsable del Kala-azar en la India, *L. donovani*, del agente causal del Kala-azar infantil en el Mediterráneo, *L. infantum* (Nicolle, 1908).

Un siglo después, muchas características de las leishmaniosis y sus principales síndromes (visceral, cutánea y mucosa) han permanecido igual, pero otras han cambiado. Como antes, la epidemiología de esta enfermedad ocurre periódicamente en India y otras zonas del mundo, pero las leishmaniosis han emergido en nuevas regiones, por ejemplo como infecciones oportunistas asociadas al SIDA. El diagnóstico todavía se basa en métodos clásicos microbiológicos, aunque se están introduciendo ya técnicas moleculares. Los antimoniales pentavalentes han sido la principal terapia antileishmaniásica durante medio siglo, pero las formulaciones lipídicas de anfotericina B (aunque muy caras y de administración parenteral) representan el mayor avance para tratar la leishmaniosis visceral. Son necesarios avances tecnológicos en la comprensión de la respuesta inmune frente a *Leishmania* y la patogénesis de la leishmaniosis para poder encontrar buenos métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención de esta enfermedad (Herwaldt, 1999).

La leishmaniosis es una enfermedad causada por un protozoo intracelular obligado que se transmite mediante un vector y se caracteriza por una gran diversidad y complejidad. La leishmaniosis es endémica de áreas tropicales, subtropicales y del

sur de Europa, en zonas que van desde los bosques americanos hasta desiertos en el oeste asiático y, desde zonas rurales a zonas periurbanas (Desjeux, 1996).



*Distribución de la leishmaniosis en el mundo (Handman, 2001).*

Varios síndromes clínicos se engloban bajo el termino leishmaniosis: **leishmaniosis visceral, cutánea y mucocutánea**, que resultan de la replicación del parásito en el sistema fagocítico mononuclear a nivel visceral, de la mucosa dérmica y de la mucosa nasoorofaríngea, respectivamente. Estos síndromes son causados por un total de 21 especies de *Leishmania* que son transmitidas por unas 30 especies de vectores de mosquitos flebótomos (Shaw, 1994; Desjeux, 1996; Ashford, 1997).

Con algunas excepciones (la leishmaniosis visceral en la India y la leishmaniosis cutánea causada por *L. tropica*), la especie humana es un hospedador accidental de la infección y, otros mamíferos, como roedores o cánidos, son hospedadores reservorios. Sin embargo, la especificidad se encuentra a través de la diversidad ya que especies particulares de parásito, vector y hospedador mantienen el ciclo de transmisión en una determinada zona ecológica (Ashford, 1996).

### 1.1. Filogenia y Taxonomía.

*Leishmania* es un protozoo flagelado que posee una única mitocondria asociada al kinetoplasto, típico del Orden *Kinetoplastida*. Este Orden también incluye a

los tripanosomas que dan nombre a la Familia *Trypanosomatidae* a la que pertenecen los protozoos del Género *Leishmania*. El Género *Leishmania*, a su vez, se divide en dos Subgéneros en función de en qué lugar del tracto digestivo del vector se multiplique (OMS, 1990). De este modo, las especies de *Leishmania*, se pueden clasificar en **Hipo-**, **Peri-** y **Suprapilaria**.

Las Hipopilaria son las más antiguas desde el punto de vista evolutivo, constituyen *Sauroleishmania* spp. y no son patógenas (Lainson y Shaw, 1987). Las Peripilaria aparecen después en la escala filogenética, están agrupadas en el Subgénero *Viannia* y se encuentran todas en el Nuevo Mundo, parasitando a mamíferos como los perezosos y los osos hormigueros. Las Suprapilaria, como su nombre indica, se multiplican en las porciones suprapilóricas (cerca de la probóscide del vector) y parasitan a mamíferos, entre ellos el hombre, siendo las más cercanas en la escala evolutiva y constituyendo el Subgénero *Leishmania*.

Dentro del **Subgénero *Viannia*** se incluyen las siguientes especies: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. colombiensis* y *L. equatorensis*. Dentro del **Subgénero *Leishmania*** se incluyen las siguientes especies: *L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), *L. tropica*, *L. killicki*, *L. major*, *L. gerbilli*, *L. arabica*, *L. mexicana* (syn. *L. pifanoi*), *L. amazonensis* (syn. *L. garnhami*), *L. aristidesi*, *L. enrietti*, *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. turanica* y *L. venezuelensis* (Alvar, 2001).

Debido a las pocas diferencias morfológicas entre los diversos miembros del género *Leishmania*, la clasificación taxonómica está basada en la enfermedad clínica producida, las características biológicas, geográficas y epidemiológicas. Donde existen mayores discrepancias es en la caracterización como especie o subespecie, es decir, en el empleo de términos binómicos o trinómicos. Desde hace muchos años se han intentado hallar los caracteres taxonómicos más idóneos y los estudios del parásito han facilitado una comprensión más básica. Ejemplos de este enfoque son los primeros estudios serológicos, la determinación de serotipos por el factor de excreción y la caracterización biológica en cultivos, flebotomos y cricetos. Más útiles han sido los métodos de biología molecular con el fin de descubrir las características intrínsecas del parásito que no se modifican por factores ambientales o propios del hospedador.

Algunos de estos métodos han puesto de relieve dichas características, que se utilizan ahora para distinguir las especies o subespecies reconocidas (OMS, 1984).

Entre los métodos bioquímicos fenotípicos más utilizados encontramos la caracterización mediante isoenzimas y los anticuerpos monoclonales. Entre los genotípicos está el polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), la hibridación con sondas del ADNk del kinetoplasto, la hibridación con sondas de ADN genómico (*in situ*, en manchas, por contacto o por aplastamiento) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes: RAPD y PCR-RFLP (Alvar, 2001).

La posición taxonómica de *L. infantum* según Cavalier Smith (1998) es la siguiente:

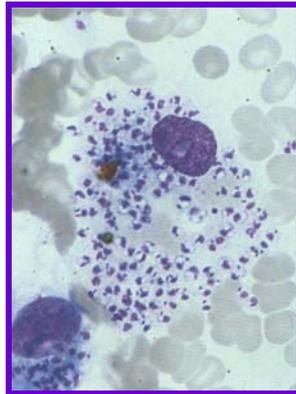
**IMPERIO O SUPER-REINO** EUKARIOTA Dougherty, 1957  
**REINO** PROTOZOA Goldfuss, 1818  
**SUBREINO** NEOZOA Cavalier Smith, 1997  
**INFRA-REINO** DISCICRISTATA Cavalier Smith, 1998  
**PHYLUM** EUGLENOZOA Cavalier Smith, 1981  
**SUBPHYLUM** SACOSTOMA Cavalier Smith, 1998  
**CLASE** KINETOPLASTA Cavalier Smith, 1998  
**SUBORDEN** TRYPANOSOMATINA Kent, 1880  
**FAMILIA** TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901  
**GENERO** *Leishmania* Ross, 1903  
**SUBGENERO** *Leishmania* Safjanova, 1982  
**ESPECIE** *Leishmania infantum* Nicolle, 1908

## **1.2. Morfología.**

Los amastigotes (del griego *mastigos*: látigo) de *Leishmania* de varias especies encontradas en mamíferos son aparentemente idénticos, pero se ha demostrado que el tamaño de esta forma varía entre distintas especies (Gardener, 1975; Scorza y cols., 1979).

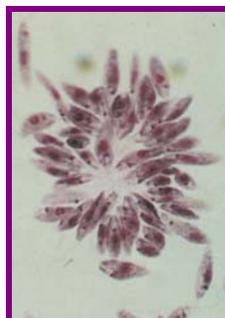
En improntas teñidas con Giemsa, los amastigotes aparecen como cuerpos redondos u ovals dentro de una célula hospedadora o, más frecuentemente, libres debido a la rotura celular producida al realizar la impronta. El núcleo del parásito ocupa

una posición central en la célula y el kinetoplasto aparece adyacente a él. El núcleo es redondo u oval. El kinetoplasto, que se tiñe más densamente que el núcleo, también varía en su forma, siendo redondo, oval, con forma de vara o curvado en perfil. Aunque la microscopía electrónica revela la presencia de un flagelo saliendo del reservorio de los amastigotes, la microscopía óptica raramente muestra este organelo (Peters y Killick-Kendrick, 1987).



***Amastigotes en impronta de médula ósea (Rondanelli y Scaglia, 1993).***

El promastigote es la forma típica de *Leishmania* encontrada en el intestino medio del vector. Killick-Kendrick y cols. (1974) observaron que en algunas especies de *Leishmania* existen dos formas de promastigotes en el intestino. Por un lado existían largos promastigotes *nectomona*, la mayoría de los cuales estaban enganchados a la pared del intestino por un flagelo típicamente largo y sin modificar, emergiendo anteriormente. Estas formas tienen un kinetoplasto típico y el núcleo está en el centro del cuerpo del parásito. El otro tipo de promastigotes descritos en el vector eran los *haptomona*, que son promastigotes cortos, gordos y más brillantes que se adhieren a la cutícula de la válvula estomacal por un flagelo modificado.



***Promastigotes formando una roseta (Rondanelli y Scaglia, 1993).***

## Revisión bibliográfica

Aproximadamente 10 días después de entrar en el insecto, el promastigote pierde la adherencia, el flagelo entonces se vuelve muy largo y el cuerpo fino y corto. Este tipo de promastigote recupera la infectividad, aunque deja de multiplicarse y se encuentra libremente en la hipofaringe, es lo que se denomina el promastigote *metacíclico* que será posteriormente inoculado por el insecto en el hospedador (Sacks y Perkins, 1984).

Dentro del hospedador el promastigote contiene el kinetoplasto paralelo al núcleo, el cuerpo se vuelve oval, la bolsa flagelar se hace muy profunda y el flagelo se empieza a acortar, esta forma se denomina *paramastigote* (Killick-Kendrick, 1979).

### 1.3. Ciclo Biológico.

*Leishmania* se caracteriza por poseer un ciclo biológico indirecto en el que intervienen un hospedador invertebrado o mosquito flebótomo y un hospedador vertebrado de sangre caliente. Numerosas especies de mosquitos del género *Lutzomyia* en América y del género *Phlebotomus* (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) en el Viejo Mundo son los vectores de *Leishmania*. En el caso de *L. infantum*, los vectores son varias especies de dípteros del género *Phlebotomus* y los hospedadores vertebrados son fundamentalmente el perro y el hombre, además de otras especies como el zorro, la rata y otros posibles reservorios silvestres esporádicos (Botet y Portús, 1993).



*Mosquito flebótomo (Rondanelli y Scaglia, 1993).*

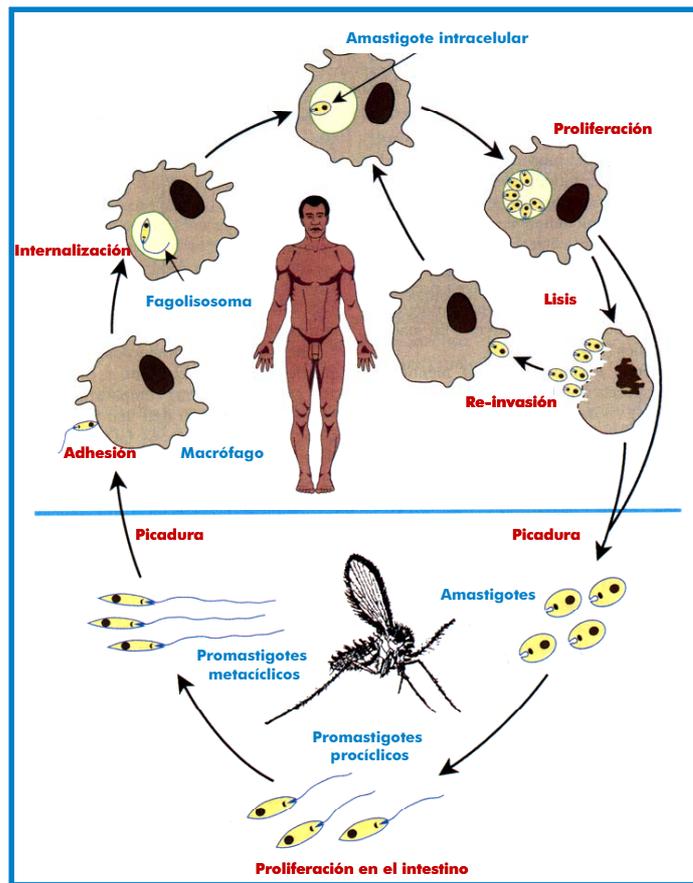
Todas las especies de *Leishmania* habitan en las células del retículo endotelial del hospedador vertebrado y en el intestino del mosquito flebótomo. Los amastigotes son ingeridos con la sangre cuando el mosquito pica al hospedador vertebrado, instaurándose en el intestino del mosquito. Muy pronto se transforman en

promastigotes, que continúan multiplicándose muy rápidamente. Tres días después de la picadura, el mosquito defeca los remanentes de la sangre y en este punto todos los parásitos que no se han adherido son eliminados. Los parásitos que han sobrevivido se adhieren por el flagelo a las microvellosidades del intestino o a la válvula pilórica. En cualquier caso, después de la defecación, los parásitos adheridos son liberados y se dividen rápidamente de nuevo, adhiriéndose eventualmente a la válvula cardíaca. Algunos parásitos se empiezan a diferenciar en formas metacíclicas, que no son adherentes y se mueven muy rápidamente. La transmisión depende de la inyección de estas formas metacíclicas en una nueva picadura (Ashford, 2000).

Cuando el promastigote alcanza los capilares cutáneos del nuevo hospedador vertebrado, se produce su fagocitosis por el macrófago en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo, mientras que las leishmanias se transforman en amastigotes que se multiplican por fisión binaria en el interior de dicha vacuola. Los amastigotes son capaces de destruir al macrófago quedando libres y entonces pueden ser fagocitados por otros macrófagos y mantener así la infección (Russell y Talamas-Rohana, 1989).

La conveniencia o conformidad del hospedador para el mantenimiento de las poblaciones de *Leishmania* depende de muchos factores, los más importantes son: la densidad de población del hospedador, la duración de la infección (y longevidad del hospedador), la localización del parásito en el hospedador y el estado inmunológico del mismo después de la cura (Ashford, 2000).

La transmisión puede verse afectada también por la naturaleza de las picaduras efectuadas por el mosquito (Schlein y Jacobson, 1994) y por la respuesta del hospedador a los antígenos de la saliva del mosquito. La transmisión, además puede ser realizada por la inoculación de material infectado de una persona a otra. Por ejemplo, hay evidencias de que muchas de la leishmaniosis viscerales asociadas a la infección por VIH en el sur de Europa son transmitidas por el uso de jeringuillas compartidas entre drogadictos (Alvar y cols., 1997; OMS, 2000; Cruz y cols., 2002). La transmisión por contacto sexual y por transfusión sanguínea es pequeña o poco significativa.



Esquema del ciclo biológico de *Leishmania*.

#### 1.4. Diversidad Clínica (Ashford, 2000; Alvar, 2001).

Una de las características más notables de las leishmaniosis es la diversidad de enfermedades causada por agentes morfológicamente similares. La 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. En experimentación animal se ha visto que la genética tiene un gran efecto en la respuesta del hospedador a la infección. Hay evidencias considerables de que el parásito más virulento de *Leishmania* puede causar enfermedades no detectables en ciertos individuos.

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 mosquito. Normalmente se cura sola, acontece 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 cutánea (Rondanelli y Scaglia, 1993).*

- **Leishmaniosis mucocutánea**, causada normalmente por *L. braziliensis*, después de la cura de una leishmaniosis cutánea inicial. 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”. Otra veces la lesión mucosa empieza en el paladar blando con posterior destrucción de la úvula. Otras lesiones pueden aparecer en la epiglotis y producen disfonías.

- **Leishmaniosis visceral o Kala-azar** (OMS, 1984; Alvar, 2001). Puede ser ampliamente restringida a niños, causada por *L. infantum*, o tener una pequeña especificidad-edad, causada por *L. donovani* o *L. infantum*. También afecta a gente 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 mostrado que la malnutrición exacerba la infección por *L. infantum*.

La infección comienza en el sitio de la picadura apareciendo a veces una lesión primaria o leishmanioma. Si se presenta, puede ser simplemente una lesión autolimitante sin que se produzca enfermedad visceral. La enfermedad 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, pasando probablemente como un simple ataque de malaria 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.



**Niño afectado de leishmaniosis visceral (Alvar, 1997).**

La leishmaniosis visceral se puede clasificar como endémica, esporádica o epidémica y las manifestaciones clínicas suelen diferir según se trate de una u otra de las tres situaciones. La **endémica** afecta sobre a todo a niños y se desarrolla en la zona del Mediterráneo, Asia sudoriental, China y América Latina. La incidencia es dos veces mayor en los hombres que en las mujeres. El periodo de incubación oscila entre 10 días y más de un año. Los síntomas más frecuentes son fiebre, malestar, pérdida de peso y anorexia; a veces aparecen tos y diarrea. Los signos clínicos más corrientes son esplenomegalia indolora a la presión (el bazo es blando a diferencia de otras esplenomegalias (*bazo de leche*)), hepatomegalia moderada (el hígado también es blando y con el reborde marcado) y linfadenopatía, consunción y palidez de las membranas mucosas. En la India es frecuente el oscurecimiento de la piel de la cara, manos, pies y abdomen (**kala-azar**: enfermedad negra). Existen signos de malnutrición

(edema y alteraciones de la piel y el cabello). A veces se producen neumonía, disentería o tuberculosis pulmonar intercurrentes.

La leishmaniosis visceral **esporádica** se da cuando las personas no nativas de cualquier edad entran en una zona endémica y contraen la enfermedad. La fiebre aparece entre tres semanas y dos años después de la exposición. La enfermedad puede avanzar de forma aguda con escalofríos, fiebre alta ondulante, sudor abundante, pérdida de peso rápida y malestar profundo. A veces aparece anemia hemolítica aguda grave, lesión renal aguda y hemorragia intensa de las mucosas. La leishmaniosis visceral **epidémica** se puede presentar en todas las edades, excepto los que hayan sido infectados en una epidemia anterior. Se produce más frecuentemente en los hombres que en las mujeres en una proporción de 4:3. Las formas agudas son raras.

También existe **enfermedad subclínica** ya que se cree que en algunos países (Italia, Kenya) los casos subclínicos superan a los casos clínicos en una proporción de 5:1.

- **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*. Se presenta ocasionalmente en pacientes sin historia de enfermedad visceral, pero solo en lugares en los que *L. donovani* es transmitida. A veces se desarrolla antes de que la infección visceral se haya curado, pero su aparición se puede retrasar hasta dos años. Es una enfermedad variable que puede empezar como una punción, despigmentación progresiva dando a la piel un aspecto de moteado o puede ser notada al principio como unas discretas pápulas, principalmente en superficies expuestas a la luz. Puede progresar produciendo una superficie extensa de pápulas o discretos nódulos.

## 2. RESPUESTA INMUNE.

### 2.1. Generalidades.

Después de la picadura, los amastigotes procedentes de macrófagos del hospedador son liberados en el intestino del mosquito donde se transforman en promastigotes procíclicos que no son infectantes (Sacks y Perkins, 1985). Estos promastigotes procíclicos expresan en su superficie grandes cantidades de lipofosfoglicano (LPG) y de la metaloproteasa gp63 (Davies y cols., 1990; Pimenta y cols., 1991).

La activación del complemento por el LPG es por la vía clásica dando lugar a la lisis de los promastigotes procíclicos, pero no metacíclicos. Como resultado, compuestos del complejo de ataque a la membrana C5-C9 son liberados de la superficie del promastigote metacíclico (Puentes y cols., 1991). La gp63 también inhibe la lisis mediada por complemento y promueve la captación del parásito, mediante la transformación de C3b en C3bi (Brittingham y Mosser, 1996). La opsonización de los parásitos con C3bi proporciona el medio adecuado por el que los promastigotes metacíclicos se unan y penetren en los macrófagos.

La muerte de *Leishmania* por parte de macrófagos está mediada por NO tanto *in vitro* (Green y cols., 1990) como *in vivo* (Stenger y cols., 1996). La fagocitosis de *Leishmania* induce fuertemente la síntesis de NO (Corradin y cols., 1999), incluso si *Leishmania* posee moléculas de superficie que inhiban la producción de NO, posiblemente a través de distintos receptores celulares. Además, la infección con *Leishmania* induce la liberación de citoquinas que inhiben la muerte mediada por NO como el TGF- $\beta$  o la IL-10 (Bogdan y Rollinghoff, 1999).

La saliva del mosquito, a través del péptido maxadilán, suprime la actividad leishmanicida del macrófago inhibiendo la producción de óxido nítrico y acelerando el desarrollo de la lesión (Lima y Titus, 1996).

Cuando el promastigote metacíclico se transforma en amastigote, ocurre la fusión fagosoma-lisosoma y los parásitos son capaces de sobrevivir y multiplicarse en la vacuola parasitófora rica en ácidos e hidrolasas (Russell y cols., 1992).

La presentación de los antígenos por parte de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de tipo II existentes en las células presentadoras de antígeno a las células T, causa la expansión del protector IFN- $\gamma$ , produciendo una respuesta CD4+ Th1, y se ha pensado durante largo tiempo que esto es esencial para el control de la infección por *Leishmania* (Liew y O'Donell, 1993).

Sin embargo, la presentación por parte de las moléculas del CMH de tipo II sola, no es suficiente para estimular la respuesta de las células T. También se necesitan moléculas coestimuladoras como la unión de B7-1/B7-2 y CD40 (en el macrófago) con CD28 y CD40L (en la célula T) respectivamente (Bogdan y cols., 1996).

Después de la presentación antigénica por parte de las moléculas de Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, las células Th proliferan a través del precursor Th0 hacia células Th1 ó Th2 que difieren en el perfil de producción de citoquinas. De hecho, las células Th1 secretan IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y proteínas inflamatorias de migración como las proteínas MIP y MIP-1; mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y el factor inhibidor de migración (MIF) (Lohoff y cols., 1998).

Generalmente se acepta que la inducción de una inmunidad protectora frente a la leishmaniosis depende de la producción de IL-12. Esta citoquina dirige la respuesta CD4+ Th1 e induce la producción de IFN- $\gamma$  tanto por los linfocitos T citotóxicos (CD8) como por células Natural Killer (NK) y células T. El IFN- $\gamma$  media en la protección induciendo la expresión de NOS2 y la producción de NO en los macrófagos infectados (Liew y O'Donell, 1993).

Los macrófagos secretan otras citoquinas además de IL-12, que no solo regulan la función de los macrófagos de una manera autocrina sino que también juegan un papel importante en la modulación de la adquisición de la respuesta inmune. Por ejemplo, el TNF- $\alpha$  y el factor quimiotáctico activador de monocitos (MCAF) pueden fomentar la actividad leishmanicida de los macrófagos (Mannheimer y cols., 1996).

El TGF- $\beta$  es un potente inhibidor de la inducción de NOS2 (Stenger y cols., 1994). En los tejidos donde se encuentra menos NOS, aparecen más parásitos, y hay

mas TGF- $\beta$  en las lesiones de ratones susceptibles que en los resistentes, a pesar de que hay cantidades parecidas de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Por lo tanto, el TGF- $\beta$  parece ser una citoquina importante capaz de disminuir la respuesta del NOS2 a las señales del IFN- $\gamma$ .

En general, la síntesis temprana de IL-4 es necesaria para el desarrollo de la respuesta Th2. En esta respuesta Th2 estimula la inmunidad humoral e inhibe la proliferación de la respuesta Th1 y hace al macrófago poco susceptible para la activación por IFN- $\gamma$ . La regulación de la respuesta humoral significa la activación de los linfocitos B con la formación consiguiente de anticuerpos, principalmente de IgG, pero que son incapaces de contrarrestar el parásito al tener una localización intracelular, por lo que la enfermedad se disemina y el ratón termina muriendo (Alvar, 2001).

La IL-4 no solo disminuye la producción de IL-12 y IFN- $\gamma$  y la expresión de IL-12, sino que también inhibe la producción de NO por los macrófagos, lo que es crítico para la actividad leishmanicida (Vouldoukis y cols., 1997; Jones y cols., 1998).

Aunque con *L. major* en ratón la dicotomía Th1/Th2 esta muy clara, en el humano y en el perro existe una respuesta combinada mucho más difícil de interpretar y de predecir. Existe una regulación cruzada de las distintas citoquinas y el balance entre ellas va a ser importante en la evolución posterior de la enfermedad (Alvar, 2001).

La leishmaniosis visceral humana causada por *L. donovani* o *L. infantum* es una enfermedad severa con diseminación generalizada del parásito al sistema retículo endotelial, como bazo, higazo y medula ósea. Los casos subclínicos o asintomáticos están identificados con bajos títulos de anticuerpos antileishmania y pueden bien mostrar una anergia a los antígenos intradérmicos y desarrollar por lo tanto enfermedad, o bien convertirse en seronegativos y en LST positivos, sugiriendo una cura espontánea (Badaró y cols., 1986; Davies y Mazloumi, 1999).

Los títulos de anticuerpos por lo general son bajos en el suero de pacientes con leishmaniosis cutánea y mucocutánea (Labrada y cols., 1989) y moderados o altos en pacientes con leishmaniosis visceral (Pearson y cols., 1986), aunque esta dicotomía no está siempre tan clara.

La respuesta humoral tiene un efecto negativo en la leishmaniosis y la proliferación de linfocitos B, causantes del exceso de producción de anticuerpos, da lugar a la formación de inmunocomplejos circulantes (López y cols., 1996) que originan patologías como la vasculitis, poliartritis y glomerulonefritis (Endo y cols., 1985). El exceso de autoanticuerpos circulantes da lugar a anemia y trombocitopenia (Valladares y cols., 1998) y los anticuerpos circulantes facilitan la fagocitosis de los amastigotes por los macrófagos, lo que es esencial para su multiplicación.

## **2.2. Modelos experimentales y respuesta inmune.**

### **2.2.1. Modelos *in vitro*.**

Los modelos *in vitro* para estudiar el metabolismo, la expresión génica o nuevos compuestos frente a *Leishmania* son heterogéneos dependiendo de la especie de *Leishmania* ensayada, el estadio del parásito, las condiciones del cultivo, así como la preparación usada en el ensayo. Es por ello, que los resultados obtenidos son diferentes y difíciles de comparar y no se pueden correlacionar bien con la respuesta *in vivo*.

El estadio de más fácil manejo *in vitro* es el promastigote por lo que es el más empleado en los estudios de susceptibilidad a fármacos. Sin embargo, muchos estudios realizados con antimoniales pentavalentes muestran menor actividad que cuando se emplean amastigotes (Callahan y cols., 1997; Ephros y cols., 1997). Esto puede ser debido a la concentración activa del fármaco dentro del fagolisosoma del macrófago que contiene al amastigote, a la metabolización del fármaco a una forma con mayor actividad o a una distinta susceptibilidad del estadio del parásito (Berman y Wyler, 1980; Roberts y cols., 1995; Callahan y cols., 1997, Ephros y cols., 1997). Por otro lado se ha visto que la composición del medio puede afectar a la susceptibilidad de los promastigotes (Petrillo-Peixoto y Beverly, 1987) y otros factores como la densidad celular y grado de crecimiento, junto con las posibles alteraciones inducidas por el fármaco en el medio de cultivo, pueden influir en los resultados obtenidos empleando promastigotes (Moreira y cols., 1995; Carrió y cols., 2000).

Debido a ello se utilizan también otros modelos *in vitro* como los cultivos axénicos de amastigotes-like o los macrófagos infectados con amastigotes (modelo intracelular).

Se han mostrado varias condiciones para muchas especies de *Leishmania* que permiten el crecimiento de una forma del parásito *in vitro* que se asemeja a los amastigotes derivados de lesiones o tejidos. Estos amastigotes "*in vitro*" se han denominado amastigotes axénicos o formas amastigotes-like (Bates, 1993; Pan y cols., 1993; Gupta y cols., 2001). Aunque estas formas no son replicas auténticas de los amastigotes derivados de lesiones, son suficientemente cercanas por lo que constituyen un magnífico modelo y se han usado ampliamente en estudios de metabolismo y expresión génica (Beverly, 2003). Los experimentos iniciales para obtener amastigotes axénicos se basaron en la observación de que el crecimiento de los promastigotes a pH ácido o alta temperatura inducía cambios en la forma y expresión génica de los promastigotes (Duncan y cols., 2001). Posteriormente, mediante la combinación de pH ácido y altas temperaturas se consiguió por primera vez la diferenciación de promastigotes de *L. mexicana* a amastigotes (Bates y cols., 1992). Estas formas permiten el desarrollo de cribados farmacológicos más representativos de la situación *in vivo*, ya que el amastigote es el estadio más relevante del parásito.

Por otro lado, el desarrollo de un modelo de infección *in vitro*, es decir, infectando macrófagos con promastigotes, ofrece múltiples aplicaciones como por ejemplo, el estudio de las interacciones receptor-ligando. Dichos estudios han permitido conocer que la fagocitosis implica dos eventos de unión: un primer paso de anclaje a través de interacciones de baja afinidad y de cinética rápida y un segundo paso de internalización posterior a una interacción de alta afinidad. En este sentido, se ha podido saber que los receptores del complemento CR1 y CR3 juegan un papel importante en el proceso de fagocitosis, ocurriendo la interacción del parásito con los CRs de tres formas: (i) en presencia de suero, activando al componente C3 del complemento y uniéndose a través del fragmento C3bi del complemento a CR3; (ii) a través de una unión independiente de suero de la proteasa de superficie gp63 a CR3; y (iii) a través de la unión del lipofosfoglicano del parásito a un sitio lectina-like en CR3 y CR1. Los receptores CR4, de fibronectina, de manosa y el receptor de glicosilación de productos finales también están implicados en la invasión. Es posible que

interacciones receptor-ligando múltiples ocurran simultáneamente, dependiendo del estado de activación del macrófago. En el caso del promastigote, se ha visto que las dos principales familias de moléculas de superficie, la gp63 y los fosfoglicanos como el lipofosfoglicano (LPG), son los principales ligandos para el anclaje a los macrófagos (Revisado en Bullen, 2002).

Este modelo de infección *in vitro* también ha resultado útil en el estudio de las bases bioquímicas de la interacción macrófago-*Leishmania*, ya que ha permitido caracterizar mecanismos de evasión de la respuesta por parte del parásito, como por ejemplo, la inhibición de la proteinkinasa C, lo que produce una entrada de  $Ca^{2+}$  en el macrófago y reduce los niveles de proteínas relacionadas con la miristoilato-alanina C kinasa, que son sustratos de la PKC. Además, se ha podido saber que *Leishmania* bloquea la fosforilación de la tirosinkinasa inducida por  $IFN-\gamma$ , con un consecuente deterioro en la producción de IL-12 y NO, y también activa a fosfotirosinofatasas que desregulan la señalización de la proteinkinasa activada por mitógenos y la expresión de c-fos y de óxido nítrico sintetasa por parte de los macrófagos. También se ha observado que la cisteinproteínasa participa en la nutrición del parásito a expensas de la célula hospedadora y juega un papel importante en la penetración en el macrófago (Brandonisio y cols., 2000).

Otros estudios realizados con el modelo promastigote-macrófago, han sido los destinados a elucidar qué citoquinas están implicadas en favorecer los mecanismos celulares microbicidas, observándose que algunas de ellas juegan un papel importante en la regulación de la producción de NO por parte de los macrófagos infectados con *Leishmania*. Así por ejemplo, el  $IFN-\gamma$  y  $TNF-\alpha$  desarrollan un papel integral en la resistencia del macrófago frente a *Leishmania* y son esenciales para la producción de niveles citotóxicos de NO. Pero la infección por *Leishmania* también induce la liberación de citoquinas que inhiben la muerte mediada por NO, como el  $TGF-\beta$  o la IL-10 (Brandonisio y cols., 2000).

Los estudios celulares de linfoproliferación han permitido observar que el factor de crecimiento hematopoyético, GM-CSF, induce la proliferación de celular a la vez que incrementa la fagocitosis y las funciones metabólicas de los macrófagos lo que da lugar a la muerte de los promastigotes (Revisado en Jones, 1996).

Otra aplicación es el estudio del efecto de la opsonización en la adhesión celular. Así, en un modelo de infección *ex vivo* con *Leishmania* y sangre humana se mostró que los promastigotes opsonizados con C3 se adherían (inmunoaderencia) a los eritrocitos antes de la fagocitosis del parásito (Domínguez y Toraño, 1999).

Por último, el estudio de agentes quimioterapéuticos en dicho modelo ha mostrado que concentraciones adecuadas de antimoniales pentavalentes, pentamidina y anfotericina B eliminan el 90-100 % de los amastigotes de diversas especies de *Leishmania* de los macrófagos humanos infectados *in vitro*, representando una ventaja frente al empleo de los promastigotes libres ya que los amastigotes son más sensibles, y, además, los macrófagos pueden concentrar y metabolizar fármacos para incrementar su toxicidad (Berman y Wyler, 1980).

Los modelos en fagocitos residentes o procedentes de líneas celulares ya establecidas han sido útiles con las diferentes cepas empleadas. Chang consiguió en 1980 el mantenimiento de una línea celular, J774.G8, infectada de manera indefinida con amastigotes de *L. amazonensis*. Pero en el caso de *L. infantum* el desarrollo del modelo ha sido más difícil, habiéndose descrito líneas celulares caninas que podían internalizar promastigotes de *L. infantum* (Brandonisio y cols., 1986). Líneas como la U937, J774.G8 o la línea THP-1 humana también han sido capaces de interactuar con el parásito (Savoia y cols., 1991; Gaspar y cols., 1992; Gebre-Hiwot y cols., 1992). Sin embargo, no se demostró una multiplicación activa de los amastigotes en su interior en ningún caso. Esto se mejoró modificando las condiciones estándares del cultivo, de manera que mediante la preincubación de los macrófagos durante 2 días a 26°C antes de realizar la infección con los promastigotes, se consiguió una mayor infectividad (Méndez y cols., 1996), demostrando posteriormente este modelo su utilidad en estudios de infectividad con distintas cepas *in vitro*, existiendo una correlación entre la infectividad *in vitro* e *in vivo* de las mismas (Méndez y cols., 2001), por lo que este dicho modelo resulta muy útil para el cribado farmacológico.

### **2.2.2. Modelos *in vivo*.**

#### **2.2.2.1. Modelo murino.**

Se han desarrollado muchos modelos experimentales de leishmaniosis. Estos modelos tienen la principal atracción de permitir el control de la genética del parásito y del hospedador, pero no reproducen enteramente la enfermedad de humanos. Uno de los factores que contribuyen a las diferencias entre humanos y animales de laboratorio es el tamaño y la naturaleza del inóculo. En las infecciones naturales el mosquito introduce en la piel un número muy pequeño de promastigotes metacíclicos junto con saliva fuertemente bioactiva, mientras que en el laboratorio se inyectan infecciones con miles de millones de promastigotes derivados de cultivos o amastigotes derivados de tejidos. El mosquito deposita el inóculo en un pequeño volumen de sangre, mientras que en las infecciones en laboratorio se realizan en volúmenes de 50  $\mu$ l o más. Además, en el laboratorio la jeringa se introduce subcutánea o intravenosamente (Handman, 2001). Un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la maduración del parásito en el mosquito y en la capacidad para mimetizar algo de esto en el laboratorio, ha dado lugar a muchos protocolos de infección mejorados. Los investigadores ahora usan por ejemplo, un pequeño número de promastigotes metacíclicos derivados *in vitro* por vía intradérmica más que subcutánea en la oreja del ratón (De Krey y Titus, 1999; Méndez y cols., 2001).

##### **2.2.2.1.1 Modelo murino de leishmaniosis cutánea.**

En la leishmaniosis cutánea la infección de cobayas con *L. enriettii* fue el primer modelo que se caracterizó. Los cobayas desarrollaban respuestas celulares T frente a los antígenos parasitarios en 2 semanas de infección y la lesión se curaba en unas 10 semanas (Mauel y cols., 1981). La principal atracción de este modelo animal es el hecho de que la combinación hospedador-parásito es natural y que el patrón es similar al observado en la leishmaniosis cutánea por *L. major*. El modelo de *L. enriettii* en cobayas ha sido sustituido por la infección de cepas consanguíneas de ratón con especies de *Leishmania* patógenas para humanos. Aunque no es perfecto, el espectro de manifestaciones de la enfermedad observado en la leishmaniosis humana puede ser mimetizado en el laboratorio con la infección de diferentes cepas consanguíneas de ratón con *L. major*.

El modelo en ratón reproduce muchos aspectos de la enfermedad en humanos, incluyendo un amplio rango de estados de susceptibilidad dependiendo de la cepa de ratón usada.

Los ratones Balb/c son altamente susceptibles y tras la infección desarrollan muchas úlceras en la piel que se expanden y metastatizan dando lugar a la muerte, y la infección produce lesiones nodulares que visceralizan, con producción de anticuerpos pero sin el desarrollo de una hipersensibilidad tardía (Alexander y Philips, 1978; Alexander y Kaye, 1985). Por el contrario, los ratones C57/BL6 y CBA/n son resistentes a la infección por *L. major* o *L. mexicana* y desarrollan lesiones pequeñas que se curan en 10-12 semanas, son resistentes a la reinfección y desarrollan respuestas inmunes humoral y de hipersensibilidad tardía (Pérez y cols., 1979; Grimaldi y cols., 1980). La mayoría de las otras cepas son intermedias en la susceptibilidad (Preston y Dumonde, 1976).

El desarrollo de la infección depende de la activación polarizada de una de las dos subpoblaciones de células T CD4+, Th1 ó Th2. Los ratones Balb/c producen sobre todo citoquinas Th2, como la IL-4, y este patrón se establece a las pocas horas de infección (Bogdan y Rollinghoff, 1998). Una diferencia importante entre ratones susceptibles y resistentes es que los resistentes son capaces de cambiar a un perfil Th1 y controlar la enfermedad (Heinzel y cols., 1991; Solbach y Laskay, 2000). Un importante factor de decisión para formar un fenotipo Th1 ó Th2 es el ambiente temprano de citoquinas y, como ya hemos visto anteriormente, la IL-12 es una de las citoquinas que contribuye significativamente al establecimiento de un fenotipo Th1 (Solbach y Laskay, 2000). Sin embargo, en ratones susceptibles Balb/c, se ha visto una producción temprana simultánea de IL-12 y de citoquinas que inhiben a la IL-12, como el TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 (Gorak y cols., 1998).

El IFN- $\gamma$ , además de controlar la resistencia temprana frente a *L. major*, también influye en el inicio de la diferenciación Th1 en ratones resistentes, no afectándose el desarrollo de la respuesta Th1 por la presencia o ausencia de IFN- $\gamma$  derivado de células no T (Scharton-Kersten y cols., 1995; Wakil y cols., 1998).

En el modelo murino con *L. major*, las células T CD4+ son la principal fuente de IL-4 temprana, lo que desemboca en una no respuesta a la IL-12 en ratones Balb/c e

induce el desarrollo de una respuesta Th2 (Launois y cols., 1997). Estudios con *L. major* encontraron que un epitopo simple derivado del antígeno parasitario LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) inducía una rápida y temprana producción de IL-4 por células T CD4<sup>+</sup> Vβ4Vα8 en ratones Balb/c susceptibles, lo que estaba correlacionado con el desarrollo de las lesiones. Pero, los ratones convertidos en tolerantes al LACK mediante expresión transgénica en el timo, exhibían una respuesta Th2 menor y un fenotipo curativo (Julia y cols., 1996; Launois y cols., 1997). Estos resultados indican que ciertos antígenos parasitarios pueden promover el desarrollo de una respuesta Th2 contraprotectora.

A pesar de las evidencias del papel exacerbador de la enfermedad de IL-4 en la infección por *L. major* en ratones susceptibles, otros estudios utilizando ratones Balb/c deficientes en IL-4 infectados con *L. major* no han sido concluyentes. Scott y cols. en 1996 demostraron que la producción temprana de IL-4 no predice necesariamente la susceptibilidad a *L. major*.

Mientras que es útil en muchos sentidos, uno debe recordar que el modelo murino es solo un modelo y que la patogénesis y la inmunidad puede ser un poco diferente en humanos por lo que la extrapolación de ratón a humano se ha de hacer con mucho cuidado (Kelso, 1995).

#### **2.2.2.1.2. Modelo murino de leishmaniosis visceral.**

Hasta hace poco no existían modelos animales de infección adecuados para estudiar el desarrollo y progresión de las infecciones causadas o por *L. donovani* o por *L. infantum*. Una de las dificultades con el ratón como modelo de leishmaniosis humana visceral es la necesidad de inyectar amastigotes intravenosamente con el fin de inducir un patrón reproducible de la colonización del bazo y el hígado. Para conseguir una infección visceral detectable en ratón, es necesario emplear un número muy elevado de parásitos, lo que está muy lejos de lo que ocurre en la infección natural. Además, los ratones no mueren y la carga parasitaria, después de un crecimiento moderado, disminuye a niveles muy bajos o indetectables, indicando que los ratones desarrollan una inmunidad protectora frente a la infección (Leclercq y cols., 1996; Engwerda y cols., 1998; Honoré y cols., 1998).

Los ratones no consanguíneos son generalmente resistentes a la infección con *L. donovani*, pero las cepas consanguíneas presentan diferencias marcadas en la susceptibilidad, lo que dio lugar a principios de los 70, al aislamiento del gen de la susceptibilidad *Lsh* (posteriormente denominado NRAMP1) (Bradley, 1974). NRAMP1 determina el grado de expansión temprana de los parásitos en hígado y bazo (Bradley, 1989; Blackwell, 1996). Los estudios con los modelos viscerales de ratón también han dado lugar a la caracterización de mecanismos inmunes importantes para el desarrollo de respuestas órgano-específicas que causan el aclaramiento de los parásitos del hígado pero no del bazo (Kaye y cols., 1995; Engwerda y Kaye, 2000). Otra contribución importante del modelo murino ha sido el descubrimiento de que la quimioterapia con antimoniales es inefectiva en ausencia de respuestas mediadas por células T intactas (Kaye y cols., 1995).

En general la respuesta inmune en cepas de ratón consanguíneas infectadas con especies de *Leishmania* viscerotrópicas, es similar a la observada en el modelo murino con *L. major*. Pero al comparar leishmaniosis cutánea y visceral en ratones Balb/c infectados con *L. donovani* se observó, que en la infección cutánea los esplenocitos y las células de los nódulos linfáticos mostraban alta respuesta linfoproliferativa parásito-específica con alta respuesta de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 y NOS2, mientras que en la infección visceral no hubo respuesta frente al antígeno (Melby y cols., 1998).

La infección por *L. donovani* en ratón ha inducido un desarrollo variable dependiendo del background genético de la cepa de ratón, vía de inoculación, dosis e infectividad del organismo (Blackwell y cols., 1980). Estudios realizados en ratones consanguíneos han identificado ciertas cepas como la C3H que es resistente, mientras que las cepas B10.D2, C57BL/10, etc siguen un fenotipo susceptible curativo o no (Blackwell y cols., 1980; Nickol y Bonventre, 1985). Sin embargo, el modelo Balb/c ha sido el más estudiado, mostrando estos animales una susceptibilidad inicial, siendo capaces, después de varias semanas, de controlar la carga parasitaria manteniendo un nivel bajo de infección crónica (Murray y cols., 1982; Wilson y cols., 1996; Mukherjee y cols., 2003).

Por otro lado, los perfiles de citoquinas en este modelo de ratón no son los típicos de una respuesta Th2. Es decir, que el claro patrón de respuesta Th1/Th2

demostrado para *L. major* o *L. mexicana* no ha sido bien observado en la leishmaniosis visceral en ratones y humanos (Honoré y cols., 1998; Kaye y cols., 1991; Kemp y cols., 1993; Miralles y cols., 1994). Aunque la resistencia a *L. donovani* esta asociada con la producción de IFN- $\gamma$ , las citoquinas Th2 no determinan susceptibilidad. De hecho ratones IL-4<sup>-/-</sup> son ligeramente más susceptibles a *L. donovani* que los controles silvestres, lo que indica que la IL-4 puede tener un efecto protector frente a la leishmaniosis visceral murina (Satoskar y cols., 1995). La incapacidad para controlar las infecciones está asociada con la pérdida de capacidad de los esplenocitos para producir IFN- $\gamma$  *in vitro* pero no la producción de IL-4 ó IL-5 (Kaye y cols., 1991).

La resistencia frente a las infecciones viscerales murinas se ha asociado con respuestas celulares que incluyen a las células CD4+ y CD8+ (Stern y cols., 1988) y el aclaramiento de parásitos de la piel en modelos viscerales obtenidos mediante inoculación intradérmica se ha correlacionado con respuesta inflamatoria e infiltración y activación de CD4+ y CD8+ (Ahmed y cols., 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo cutáneo o visceral puede depender de interacciones entre el genotipo del parásito y del hospedador mas que exclusivamente del parásito. Debido a las limitaciones del sistema experimental murino usando cepas visceralizantes humanas como *L. donovani* y *L. infantum*, se ha propuesto que la leishmaniosis visceral inducida en Balb/c por la cepa dermatrópica *L. major* puede ser un modelo mejor para la leishmaniosis visceral (Handman, 2001).

#### **2.2.2.2. Modelo en criceto.**

Se ha visto que distintas cepas de *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum* infectan al criceto, induciendo una forma fulminante de leishmaniosis visceral que progresa hacia la muerte del animal (Hommel y cols., 1995), aunque los estudios inmunológicos en el criceto han caído, en comparación con otros modelos, debido a la ausencia de reactivos inmunológicos, existiendo pocos trabajos al respecto.



***Criceto dorado (Harlan Ibérica S.A.).***

Sin embargo, hace ya años que se empezó a utilizar el criceto como modelo experimental en la inmunología de la leishmaniosis. Por ejemplo, en 1976 Farrell observó que el criceto dorado era capaz de adquirir resistencia a la infección inducida por *L. donovani*, mediante la exposición previa a la infección subcutánea con el mismo parásito.

Goto y cols. observaron en 1987 que los cricetos infectados con *L. major* también constituían un modelo interesante de leishmaniosis visceral ya que todos los animales desarrollaban la enfermedad, con test cutáneo negativo, presencia de anticuerpos y diseminación del parásito en hígado y bazo al igual que en humanos. En el mismo año, Ghosh y Ghosh estudiaron el patrón de infección en cricetos infectados con diferentes aislados de pacientes indios con Kala-azar, y observaron que las cepas de *L. donovani* más virulentas producían una infección masiva, con hepatoesplenomegalia, cargas parasitarias altas en hígado y bazo, anemia, leucopenia, hipergammaglobulinemia, aumento de anticuerpos y baja respuesta linfoproliferativa y de hipersensibilidad retardada frente al antígeno.

En cricetos infectados con *L. infantum* no hubo cambios en las concentraciones de urea, creatinina o nitratos, ni antes ni después del tratamiento con anfotericina B, el cual produjo un descenso del 98,2% en la carga parasitaria, sin reducción de los niveles de anticuerpos. Es decir, no existió producción de NO, al contrario de lo que ocurre en ratón, por lo que parece que el NO no estaría implicado en el efecto curativo de la anfotericina B en este modelo (Bories y cols., 1998).

En otro estudio, en el que se ensayaron distintas dosis de infección por *L. infantum* por vía intracardiaca, realizándose un seguimiento de un año, se mostró que existirían tres grupos de animales: sintomáticos o susceptibles, oligosintomáticos y

resistentes, al igual que ocurre en perros y humanos (Requena y cols., 2000). Estos autores observaron que existía una correlación entre la cantidad de inoculo y el tiempo de aparición de los síntomas clínicos externos y también en relación con algunos parámetros inmunológicos. Un descubrimiento importante fue que cerca de la mitad de los animales, independientemente del tamaño del inoculo, no desarrollan síntomas externos de leishmaniosis visceral. También se encontró una correlación entre el tamaño del inoculo y el momento en que se detectaba la respuesta humoral anti-*Leishmania* y cuando se analizaron los anticuerpos en riñón, se observó que existía una relación entre la presencia de anticuerpos en este tejido y la aparición de los síntomas.

Existen diferencias entre la infección con amastigotes o con promastigotes de *L. infantum* por vía intraperitoneal en cricetos. Las células esplénicas respondieron fuertemente al antígeno específico en las primeras semanas post-infección, pero en el momento del pico en la carga parasitaria los índices de estimulación disminuyeron en ambos casos. En ambos grupos existía reconocimiento de antígenos de 21, 31, 40-42, 47-50, 54-58, 63-69, 70-76, 80-88, 91-97, 100-107 y 110-118 kDa, pero el patrón de reconocimiento era muy heterogéneo, no existiendo correlación con los cambios en la carga parasitaria. La principal diferencia entre la infección por amastigotes y promastigotes fue el tiempo de incubación que fue mayor en el segundo caso (Riça-Capela y cols., 2003).

Anteriormente, se había observado en cricetos infectados con *L. donovani* que aparecían anticuerpos frente a antígeno de promastigotes de 26, 35, 46, 59, 69, 107 y 120 KDa (Evans y cols., 1990).

La proteína GRP94 de *L. infantum*, que es muy abundante en el retículo endoplásmico y esta asociada con el procesamiento antigénico, ha demostrado ser una diana importante durante la leishmaniosis visceral en cricetos, pudiéndose emplear como marcador temprano de infección (Larreta, 2002).

Otros estudios sobre la respuesta humoral han sido los realizados por Campos-Neto y Bunn-Moreno en 1982, que mostraron que los cricetos infectados con *L. donovani* desarrollaban anticuerpos frente al parásito e hipergammaglobulinemia debido a la activación policlonal de las células B. Posteriormente, se observó que el

extracto bruto de *L. donovani* inducía *in vitro* a las células B a producir anticuerpos, pero esa activación parecía ser independiente de un posible efecto mitogénico sobre las células B (Bunn-Moreno y cols., 1985).

Al emplear el inmunosupresor ciclofosfamida se bloqueó la aparición de anticuerpos específicos y policlonales frente a la infección por *L. donovani*, debido posiblemente a un efecto sobre la población de células T implicadas en el control de la producción de anticuerpos por las células B (Otero y cols., 1993).

La presencia de antígenos de *L. donovani* e inmunoglobulinas de criceto en riñón, originó una glomerulonefritis proliferativa mesangial progresiva, asociándose con deposición amiloidea (Oliveira y cols., 1985; Sartori y cols., 1987). Los eluidos de riñón, mostraron especificidad por el antígeno de *L. donovani* y por inmunoglobulinas de criceto, detectándose proteínas de 134, 110, 93, 89, 82, 52, 48, 31 y 26 KDa, y reconociendo la IgG de cricetos infectados la proteína de 134 KDa (Sartori y cols., 1991).

También se han detectado inmunoglobulinas en otros órganos como pulmón e hígado de cricetos infectados con *L. chagasi* (Mathias y cols., 2001). Por otro lado, el cortex y la medula de las glándulas adrenales mostraron una deposición progresiva de fibras amiloideas en cricetos infectados con *L. infantum*, dando lugar a la destrucción parcial del parénquima adrenal (Novoa y cols., 1990).

En cuanto a la respuesta linfoproliferativa, durante la infección por *L. donovani* en cricetos se produce una fuerte inmunosupresión, existiendo dos tipos de inhibición: la anergia inespecífica frente a concanavalina A y una inmunosupresión antígeno-específica mediada por la población celular no adherente (células T), que se restauraba después del tratamiento con Glucantime® (Nickol y Bonventre, 1985). Al contrario que en el trabajo anterior, la eliminación de las células adherentes restauró la capacidad de los esplenocitos para responder al antígeno y además esas células adherentes supresoras, que tenían características de macrófagos, parece que no eran las responsables de la incapacidad de las células periféricas para responder al antígeno (Gifawesen y Farrell, 1989).

Esto se confirmó más tarde, ya que la eliminación de las células adherentes, con características de macrófagos, en cricetos infectados con *L. donovani*, también restauró la respuesta proliferativa frente a forbolmiristato e ionomicina. Además, se observó que la generación de NO por las células adherentes era, por lo menos en parte, responsable de la inhibición de la proliferación al utilizar concanavalina A (Dasgupta y cols., 1999).

Recientemente, se ha visto que el efecto supresor que ejercen las células adherentes sobre la respuesta proliferativa, está mediado por una inhibición en la activación de una ruta metabólica en la que interviene la proteinkinasa C (PKC). Esta supresión puede ser revertida por el ácido okadaico, que es un inhibidor de la fosfatasa serina-treonina, y por anti-TGF- $\beta$  (Mookerjee y cols., 2003).

Las células adherentes de bazo fueron incapaces de presentar los antígenos de *L. donovani* pero si otros antígenos no relacionados, y las células T no respondieron a los antígenos del parásito incluso cuando fueron presentados por macrófagos normales. Todo esto demuestra que las células esplénicas presentadoras de antígeno eran incapaces de mediar en la proliferación de las células T selectivamente frente a los antígenos del parásito (Rodrigues y cols., 1992).

Las células presentadoras de antígenos (esplenocitos adherentes) de cricetos infectados con *L. donovani* producían altos niveles de TGF- $\beta$ , indicando que dicha citoquina participa fuertemente durante el curso de la infección en este modelo animal (Rodrigues y cols., 1998).

Por otro lado, se ha visto que factores humorales (inmunoglobulinas, factores reumatoides o triglicéridos) del suero de criceto infectados con *L. donovani*, inhibían respuesta proliferativa frente a concanavalina A (Evans y cols., 1990). Previamente, se había observado que la inmunosupresión en cricetos infectados por *L. braziliensis* o por *L. donovani* estaba relacionada con proteínas séricas probablemente del hospedador (O'Daly y Cabrera, 1986).

Los lípidos del suero provocaron inhibición de la proliferación celular en esplenocitos de cricetos normales a los que se les añadieron mitógenos y suero de cricetos infectados con altos niveles de triglicéridos, revirtiéndose la inhibición al añadir

albúmina sérica bovina, que es un carrier de ácidos grasos libres (Vasconcellos y cols., 1996).

También se vio que el sistema del complemento juega un papel importante en la reacción inflamatoria y en la fagocitosis, en cricetos inoculados con promastigotes de *L. chagasi*, puesto que la depleción del complemento disminuyó la fagocitosis de los parásitos por células polimorfonucleares y por macrófagos, lo que afectó a la evolución de la infección (Laurenti y cols., 1996).

Por otro lado, se observó un incremento en el porcentaje de células Natural Killer al comienzo de la infección, que no fue capaz de detener el desarrollo de la infección (Sartori y cols., 1999).

La ausencia de reactivos inmunológicos para criceto empezó a ser menos problemática a partir del trabajo de Melby y cols. en 1998, en el que se clonaron y secuenciaron porciones de IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p40 y TGF- $\beta$ , determinándose la expresión de estos genes en cricetos infectados con *L. donovani* durante 56 días, encontrando: (i) expresión basal de IL-4; (ii) fuerte expresión de citoquinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF); (iii) ausencia de expresión de RNAm de óxido nítrico sintetasa; y (iv) en los estadios tempranos aún no se expresaban IL-10 ó TGF- $\beta$  (Melby, 1998 y 2001).

El estudio de estas citoquinas en cricetos afectados de leishmaniosis cutánea muestra que la expresión de citoquinas desactivantes de macrófagos de tipo Th2 y/o la respuesta exagerada de citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 pueden contribuir a la severidad de las lesiones (Osorio y cols., 2003).

Como veremos más adelante (apartado 3.1.4), el criceto dorado se ha empleado con éxito en ensayos farmacológicos en los que se empleaba anfotericina B (Berman y cols., 1986; Berman y cols., 1992; Agrawal y cols., 2002). Pero además, se han ensayado otras sustancias con fines inmunoterapéuticos en cricetos como la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Ghose y cols., 1999), la proteína papLe22 (Fragaki y cols., 2001), ciertos lipopéptidos análogos a muramildipéptido (MDP) (Zehra y cols., 1995) o el picroliv, el glucósido iridoide de *Picrorhiza kurroa* (Puri y Saxena, 1992). El propio parásito también ha sido empleado como inmunoprolifáctico en un

modelo de leishmaniosis visceral criceto (Mukhopadhyay y cols., 1999) y las vacunas de *L. donovani* y *L. major* autoclavadas en unión a BCG, también han demostrado su utilidad profiláctica frente a la leishmaniosis visceral en este modelo (Srivastava y cols., 2003).

### **2.2.2.3. Modelo canino.**

Como ya hemos visto, el perro actúa como reservorio de la leishmaniosis y, además, en numerosas ocasiones sufre la enfermedad. 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 el control en determinadas áreas endémicas (Miró y Fraile, 1999).



#### ***Perro afectado de leishmaniosis, con atrofia muscular y dermatitis (Alvar, 1997).***

El perro es un buen modelo para la leishmaniosis humana, porque en él los síntomas de la enfermedad son similares a los que se desarrollan en humanos (Peters y Killick-Kendrick, 1987). Las investigaciones realizadas en los últimos años han permitido la estandarización del trabajo de laboratorio con perros y ahora existen herramientas específicas básicas para los ensayos experimentales. La producción de anticuerpos monoclonales frente a los homólogos caninos de los clusters de diferenciación antigénicos humanos (Cobbold y cols., 1994), proporciona la oportunidad de definir subpoblaciones linfoides caninas (Williams, 1997) y monitorizar estas clases celulares bajo condiciones normales (Rabanal y cols., 1995; Weiss, 2001) y patológicas (Bourdoiseau y cols., 1997; Sinke, 1997).

De forma más o menos teórica se suponen dos tipos de respuesta inmune: una respuesta celular eficaz, basada en la producción de linfocitos Th1 que producen IFN- $\gamma$

e IL-2, potentes activadores de macrófagos. Este tipo de respuesta solo se observa en un porcentaje inferior al 10% de los perros enfermos, considerados como animales resistentes presentando anticuerpos negativos, pero una respuesta proliferativa positiva de las células T frente a antígenos de *Leishmania*, con respuesta similar a las personas inmunocompetentes frente a la infección por *Leishmania*.

La otra respuesta es una respuesta humoral ineficaz, propia de la mayoría de los perros afectados (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 de la enfermedad.

En los casos en que la respuesta inmune no es eficaz, se produce la diseminación del parásito principalmente a los órganos hematopoyéticos (bazo, medula 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 y Fraile, 1999).

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 ha sido asociada a una reactividad significativa de las células inmunes (Solano-Gallego y cols., 2000).

Respecto a la polarización de las respuestas Th1 ó 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 ramas, hasta que por motivos desconocidos, se polariza en un sentido u otro. 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).

Un hecho muy significativo en la leishmaniosis canina es, la caída progresiva de linfocitos CD4+ (Moreno y cols., 1999) entre el sexto y el octavo mes después de la infección, cuando empieza a aparecer la sintomatología. Desde las primeras semanas también se observa un aumento en los linfocitos CD28+ que son precursores de los linfocitos B, y por eso se exagera la respuesta humoral. Además, al igual que en humanos, esta alta respuesta de inmunoglobulinas es favorecedora para el parásito porque los anticuerpos facilitan su fagocitosis por parte del macrófago (Slappendel, 1988).

Como nuestro trabajo se basa en el desarrollo de modelos experimentales, repasaremos más detenidamente solo los estudios realizados en perros experimentalmente infectados.

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* y existe una correlación entre los niveles de IgG1 e IgG2 y la progresión de la enfermedad (Nieto y cols., 1999; Leandro y cols., 2001; Solano-Gallego y cols., 2001).

Se ha encontrado 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 y cols., 1996). El reconocimiento de la banda de 26 KDa desapareció después del tratamiento, apareciendo en ese momento dos proteínas de 85 y 110 KDa (Lasri y cols., 2003). Por otro lado, en perros tratados con antimonio de meglumine se produjo un descenso en la intensidad de las bandas en la región de 12-30 KDa (Riera y cols., 1999).

En leishmaniosis canina experimental se ha observado una respuesta celular B notable, pero los ensayos de transformación de linfocitos mostraron una ausencia de respuesta de las células T durante la enfermedad (Martínez-Moreno y cols., 1993).

Tres años después de la infección experimental, los perros resistentes respondieron frente al antígeno, con ausencia de anticuerpos, pero en los sintomáticos ocurrió lo contrario. En ambos grupos existió respuesta frente a concanavalina A y

también existieron IL-2 y TNF en los sobrenadantes de las células periféricas de los asintomáticos (Pinelli y cols., 1994).

Al comparar infecciones naturales y experimentales, hubo falta de respuesta celular frente al antígeno de *Leishmania* en todos los casos, mientras que las respuestas inespecíficas frente a mitógenos fueron normales, estando parcialmente suprimidas en animales infectados naturalmente (Martínez-Moreno y cols., 1995). Por otro lado, Rhalem y cols. (1999), observaron proliferación temprana frente a antígeno bruto y a la fracción purificada gp63, que disminuía al aparecer los síntomas.

En el caso de perros infectados con amastigotes o promastigotes, existió alta proliferación frente a concanavalina A en todos los grupos, observándose en los infectados con promastigotes una fuerte respuesta linfoproliferativa frente al antígeno (Leandro y cols., 2001).

En cuanto a las citoquinas, en las células de sangre periférica de perros Beagle infectados con amastigotes, existió un incremento en la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-2, mientras que la IL-12 e IL-10 solo se detectaron esporádicamente en algunos animales. En los perros no infectados, solo se detectó IFN- $\gamma$  en células estimuladas con concanavalina A y no hubo relación entre la respuesta humoral, celular o la severidad con la IL-10, sugiriendo todo esto un establecimiento silencioso del parásito (Santos-Gomes y cols., 2002).

### **3. ANFOTERICINA B Y SUS FORMULACIONES.**

Tanto el tratamiento de la leishmaniosis visceral como cutánea, ha sido mejorado en los últimos 15 años mediante la introducción de fármacos y formulaciones alternativas, sin embargo, el arsenal terapéutico contra la leishmaniosis visceral es aún limitado. Una revisión de la farmacocinética de los **antimoniales pentavalentes** estándares condujo al uso de dosis altas de estos fármacos durante los años 80; esto fue necesario para el tratamiento de la leishmaniosis visceral en India y Kenia después de la existencia de una época de dramático descenso en las curaciones a las dosis recomendadas previamente (Olliaro y Bryceson, 1993). Debido a ello, los antimoniales ya no pueden ser usados en el noreste indio, donde la incidencia de la leishmaniosis visceral es mayor, por la aparición de resistencias.

Otros fármacos de segunda elección tradicionales, como la **anfotericina B** y la **pentamidina**, han re-emergido frente a *Leishmania* debido al desarrollo de formulaciones mejoradas. El uso del antibiótico poliénico anfotericina B estaba hasta hace poco tiempo limitado por su toxicidad. Las formulaciones lipídicas con anfotericina B, con menor toxicidad, originalmente desarrolladas para el tratamiento de micosis sistémicas, han sido explotadas con éxito en la leishmaniosis visceral pero no son asequibles en países menos desarrollados. Otro antibiótico, la **paramomicina (aminosidina)**, también ha sido formulado para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea y visceral. El **alopurinol** se ha usado en estudios clínicos de leishmaniosis visceral y cutánea, al igual que el **ketoconazol** y el **itraconazol**, pero los resultados han sido equívocos. La primera medicación oral frente a la leishmaniosis visceral, **miltefosina**, registrada en la India, todavía está en fase de estudio y, además, es abortiva y teratogénica. El desarrollo de un segundo fármaco oral, la **sitamaquina**, está siendo muy lento. Al igual que en humanos, el tratamiento de la leishmaniosis canina continúa siendo problemático ya que los antimoniales, la anfotericina B y la paramomicina tienen eficacia limitada (Croft, 1997; Guerin y cols., 2002).

Las limitaciones de la terapia antimonial en perros, como la inducción de resistencias, ausencia de cura parasitológica, toxicidad y alto coste, también han conducido, al igual que en humanos, a la búsqueda de otras alternativas más asequibles y de mayor eficacia. Es difícil establecer en perros una infección experimental que mimetice el curso natural de la infección. Por eso, los experimentos controlados de respuesta a fármacos antiprotozoosícos son pocos. Sin embargo, existen varios trabajos publicados sobre la terapia de la enfermedad adquirida naturalmente, que evalúan aspectos sobre la respuesta terapéutica, como cambios en el estado clínico y parámetros inmunológicos (Baneth y Shaw, 2002). Así, una buena respuesta terapéutica está marcada por un descenso en los niveles de anticuerpos y recuperación de la inmunidad mediada por células (Deplazes y cols., 1992; Vercammen y cols., 1995; Moreno y cols., 1999; Rhalem y cols., 1999).

### 3.1. Eficacia de la 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 y cols., 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 y cols., 1998). También se utiliza en cardiopatas, embarazadas y otras situaciones en las que los antimoniales están contraindicados (Alvar, 2001).

### **3.1.1. Eficacia en humanos.**

La anfotericina B convencional es la **anfotericina B desoxicolato (Fungizona®)**. En la India se ha obtenido un 98% de curación tanto en pacientes no respondedores a antimoniales, como en pacientes no tratados previamente. El régimen más usado es de 14 infusiones de 0.5 mg/Kg en días alternos o 1 mg/Kg/día durante 20 días respectivamente (Mishra y cols., 1992; Thakur y cols., 1999). La anfotericina B se une a las proteínas plasmáticas para, de forma inmediata, fijarse a las membranas celulares, lo que hace que su eliminación sea lenta (Hoeprich, 1990). Presenta efectos secundarios como anorexia, náuseas, vómitos, tromboflebitis, fiebre, escalofríos, artromialgias, elevación de la urea y creatinina (Crofts, 1976) y la ya citada toxicidad renal, que representan un gran problema. Debido a la toxicidad, se tiende a usarla en días alternos; por ejemplo en 15 infusiones de 0.75-1 mg/Kg cada dos días durante 30 días (dosis total de 11-15 mg/Kg). De 230 personas en Bihar que emplearon este régimen, el 96% completaron el tratamiento y hubo un 97-98% de curación (curación mayor que los que recibieron una dosis total de 11-15 mg/Kg) (Murray, 2000).

Las formulaciones lipídicas de anfotericina B fueron usadas por primera vez en pacientes resistentes a los antimoniales por Davidson y cols. en 1991, y se ha probado

que incrementan la eficacia y limitan la toxicidad de la anfotericina B convencional (Dietze y cols., 1995; Davidson y cols., 1996; Sundar y Murray, 1996). Estas formulaciones permiten aumentar la dosis diaria y parece que penetran en los macrófagos infectados mediante fagocitosis (Murray, 2001).

Básicamente, estas formulaciones se basan en el principio de que después de la infusión de la anfotericina B asociada a lípidos, ésta es captada por las células del sistema reticuloendotelial, reduciendo así la toxicidad y dirigiendo el principio activo hacia las células diana. La recaptación renal de estos fármacos es pobre, por lo que la nefrotoxicidad es mínima. Además, con estas formulaciones es posible liberar una gran cantidad de anfotericina B en un periodo corto de tiempo (Sundar, 2001).

Existen varias formulaciones lipídicas disponibles: **Ambisome**<sup>®</sup>, que es una formulación que utiliza liposomas esféricos unilaminares de menos de 100 nm de tamaño; **Amphocil**<sup>®</sup> o **Amphotec**<sup>®</sup>, que es una dispersión con sulfato de colesterol en una proporción 1:1; y **Abelcet**<sup>®</sup>, que es una estructura lipídica en forma de cinta que utiliza una matriz de fosfolípidos. Los regímenes de infusión diaria durante 5 días o hasta 10 días (días 1-5 y día 10) han demostrado ser muy activos (Dietze y cols., 1995; Davidson y cols., 1996; Sundar y Murray, 1996; Sundar y cols., 1997).

Abelcet<sup>®</sup> por ejemplo, ha demostrado su eficacia en 25 casos de leishmaniosis visceral de enfermos indios, los cuales permanecieron asintomáticos y sin parásitos en médula ósea seis meses después del tratamiento (Sundar y Murray, 1996). Su gran tamaño hace que sean fagocitados por los macrófagos circulantes y que no alcancen los tejidos en una alta proporción.

Amphocil<sup>®</sup> fue la primera formulación lipídica que se uso en kala-azar. En Brasil con 2 mg/Kg/día durante 7-10 días (dosis total de 14-20 mg/Kg), 19 de 19 pacientes se curaron y de los que la tomaron durante solo 5 días (dosis total de 10 mg/Kg), se curaron 9 de 10 (Dietze y cols., 1993; Dietze y cols., 1995).

Pero la formulación lipídica más usada es AmBisome<sup>®</sup>. Esta formulación no se disocia en los medios acuosos, por lo que su acción es prolongada y da tiempo para que no solo los macrófagos circulantes, sino también los tisulares la fagociten (Montalbán y cols., 1990). Una vez en el macrófago, se fusiona la membrana del

liposoma con la de la vacuola parasitófora, en cuyo interior se libera la anfotericina B que se une a los esteroides de la membrana del amastigote. En ella provoca poros con las siguientes pérdidas de protones y cationes, además de poner en marcha reacciones oxidativas contra el parásito por acción del propio fármaco y desencadenar la cascada de iones derivados del oxígeno propia del macrófago, todos ellos potentes leishmanicidas.

Sin embargo, todas estas formulaciones poseen una desventaja muy grande que es su elevado coste. El uso de dosis más bajas o de regímenes más cortos (por ejemplo la terapia en una única dosis) y los ensayos con preparaciones genéricas de mezclas de lípidos, representan una respuesta al problema del elevado coste (Murray, 2001).

Pero además del alto coste, existen otros factores que inducen al ensayo con dosis únicas de la anfotericina B en formulaciones lipídicas, como por ejemplo la observación de que la administración de dosis totales de solo 3.75 mg/Kg (AmBisome<sup>®</sup>) o 5 mg/Kg (Abelcet<sup>®</sup>) durante 5 días (0.75 ó 1 mg/Kg/día respectivamente), inducían una respuesta curativa del 85-90% (Sundar y cols., 1997; Sundar y cols., 2001). AmBisome<sup>®</sup> en Brasil produjo un 78% de curación al usarlo durante 10 días (dosis total de 10-20 mg/Kg) (Freire y cols., 1997). Ambas formulaciones son muy eficaces en cursos cortos de terapia, ya sea en 5-10 días (Dietze y cols., 1993; Dietze y cols., 1995; Seaman y cols., 1995; Davidson y cols., 1996; Sundar y Murray, 1996; di Martino y cols., 1997; Freire y cols., 1997; Sundar y cols., 1997; Berman y cols., 1998; Berman y Dietze, 1999; Sundar y cols., 1999) o en dosis única. Lo normal, es la administración en 5-10 días de 1-2 mg/Kg/día (dosis total de 5-10 mg/Kg) (Sundar y cols., 1997; Sundar y cols., 1998).

El primer ensayo llevado a cabo en la India con una única dosis de Abelcet<sup>®</sup> (5 mg/Kg), produjo una curación de un 70% (Sundar y cols., 1998). Por otro lado, una única dosis de AmBisome<sup>®</sup> de 5 mg/Kg ó 7.5 mg/Kg (Sundar y cols., 2000) inducía una curación de 91 y 90% respectivamente. En un ensayo con 203 individuos tratados con 7.5 mg/Kg, todos fueron liberados a las 24 horas del tratamiento, indicando así también un alto nivel de eficacia.

La naturaleza estable y larga circulación de AmBisome<sup>®</sup> (Bekersky y cols., 2000) puede explicar su alta eficacia en regímenes simples. Mientras que este régimen aún no ha sido probado fuera de la India, el atractivo clínico es obvio. Pero a pesar de la utilización de una única dosis, el tratamiento aún sigue siendo caro.

Al comparar la dosis única de 5 mg/Kg de Abelcet<sup>®</sup> con la administración de 1 mg/Kg durante 5 días, se llegó a la conclusión de que es más eficaz la administración de los 5 mg/Kg repartidos en 5 días. Además, el alto coste de Abelcet<sup>®</sup> impide su utilización masiva y hace que no pueda competir con los regímenes de 30-40 días de la anfotericina B convencional, porque sigue siendo más caro (Sundar y cols., 1998). En otro caso, cincuenta y ocho pacientes que no respondieron o recayeron después del tratamiento con antimoniales pentavalentes, fueron tratados con dosis totales de Abecelt<sup>®</sup> de 7.5 ó 10 mg/Kg repartidas en 5 días. La respuesta al tratamiento fue muy rápida en ambos casos, con curas del 79 y 90% respectivamente. Se observó que la dosis de 7.5 era menos efectiva que la de 10, pero no presentaba ventajas sobre la de 5 mg/Kg, dosis que los mismos autores habían empleado en otro estudio con un 84% de curación (Sundar y cols., 1999).

En la cuenca mediterránea también se han probado distintos cursos y dosis de terapia. Los estudios realizados con niños inmunocompetentes infectados con *Leishmania* muestran una gran eficacia de AmBisome<sup>®</sup> (di Martino y cols., 1997; Castagnola y cols., 1996; Figueras y cols., 2003; Syriopoulou y cols., 2003).

De los tres regímenes estudiados con AmBisome<sup>®</sup> en pacientes que no habían respondido a los antimoniales pentavalentes o la aminosidina, se concluye que el mejor era el de 6 dosis de 3-5 mg/Kg los días 0, 3, 6, 8, 10 y 13 (Seaman y col, 1995).

En el caso de individuos inmunocompetentes e individuos inmunocomprometidos (infectados por VIH) tratados con AmBisome<sup>®</sup>, se obtuvieron resultados distintos. El tratamiento con AmBisome<sup>®</sup> fue muy bueno y bien tolerado en individuos inmunocompetentes, pero los pacientes inmunodeprimidos tendrían que mantener la terapia durante más tiempo para evitar recaídas (Davidson y cols., 1994).

A pesar de las recomendaciones comerciales en contra de las mezclas, en la India se han evaluado tratamientos de curso corto con emulsiones de anfotericina B y

grasas en un intento de duplicar los efectos clínicos beneficiosos y de reducir el coste. Sesenta y cinco de setenta pacientes (93%) se curaron después de recibir infusiones en 5 días alternos de 2 mg de anfotericina B/Kg, mezclada con un 20% de emulsión lipídica (Sundar y cols., 2000). Aunque estas mezclas son bastante discutidas, podrían representar un tratamiento efectivo y no muy caro en pacientes con leishmaniosis visceral, pero no se han realizado ensayos adicionales debido a las dificultades para estandarizar estas preparaciones.

Se han observado diferencias regionales en la respuesta a las formulaciones lipídicas, que pueden estar relacionadas con la edad del paciente, la infectividad de la cepa de *Leishmania* y/o la carga parasitaria visceral (Murray, 2000). Así, la leishmaniosis india responde mejor a Abelcet® y a AmBisome® (Sundar y cols., 1997; Berman y cols., 1998; Sundar y cols., 2000). En el Mediterráneo, una dosis total de 18-24 mg/Kg de AmBisome® es eficaz en comparación con 6-14 mg/Kg en la India (Gradoni, 1996; Thakur y cols., 1996; Herwaldt, 1999). La infección en Brasil, causada por *L. chagasi*, responde mejor a Amphocil®, pero responde menos a AmBisome® (Dietze y cols., 1995; Freire y cols., 1997; Berman y cols., 1998). En la zona mediterránea, donde el agente causal es *L. infantum*, se requieren dosis totales mayores de AmBisome® pero la respuesta es casi del 100% (di Martino y cols., 1997).

También se ha ensayado anfotericina B asociada a lípidos parenterales (**Intralipid®**), en casos de leishmaniosis visceral en individuos inmunocompetentes. Con dosis progresivas de 0.05-1 mg/Kg/día durante 25 días o con una dosis total de 20 mg/Kg en 2 horas de infusión, se consiguió curación total durante los 6 primeros meses de seguimiento (Thakur y cols., 1996).

### **3.1.2. Eficacia en perros.**

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. En un trabajo publicado usando la forma libre de anfotericina B por infusión intravenosa rápida en un rango de dosis de

0.5 a 0.8 mg/Kg 2-3 veces semanalmente, se obtuvo mejoría clínica en el 85% de los perros infectados, al menos durante los 6 meses siguientes al tratamiento (Lamothe, 1997). De los 39 perros de este estudio 22 fueron tratados por primera vez con anfotericina B (los demás habían sido ya tratados con antimoniales) y de ellos el 93% se curaron clínicamente y se consiguió una supervivencia del 82% al año y del 76% a los dos años. Después del tratamiento fueron disminuyendo los niveles de anticuerpos específicos, se normalizaron las concentraciones de proteínas totales y aumentó al albúmina. Sin embargo, hubo que suspender temporalmente el tratamiento debido a los síntomas de toxicidad.

La estrecha monitorización de la función renal es necesaria durante el tratamiento, y es necesaria una suspensión temporal del mismo cuando los niveles de creatinina alcanzan los 250 micromoles/L. Se ha demostrado que la administración subcutánea lenta de una dosis adecuada de anfotericina B libre diluida en 0.45% de dextrosa salina reduce la nefrotoxicidad, sin interferir en la eficacia (Malik y cols., 1996).

Pero a pesar de su elevada toxicidad y de la administración engorrosa muchos clínicos emplean la anfotericina B libre como fármaco de primera elección. Por ejemplo, en un estudio realizado en una clínica veterinaria de Madrid se trataron 67 perros con anfotericina B con un total de 30 dosis de la siguiente manera: una dosis de 0.2 mg/Kg 1 día, otra dosis de 0.3 mg/Kg el segundo día y 27 dosis de 0.4 mg/Kg los 27 días restantes y se observó una remisión de un 95% con desaparición de síntomas clínicos, mejora en los perfiles proteicos sanguíneos y descenso en los títulos de anticuerpos, existiendo recaída en el 17% de los animales (Delgado, 2000). En perros tratados dos veces por semana con una dosis creciente de entre 0.8 y 2.5 mg/Kg de anfotericina B lipídica durante 8-10 sesiones, se produjo la cura clínica justo después del tratamiento, pero posteriormente se produjeron recaídas (Cortadellas, 2003).

Las formulaciones lipídicas de anfotericina B permiten aumentar la dosis (3 mg/Kg) en perros y no administrarla tan frecuentemente. Sin embargo, el uso de estas formulaciones está limitado por su elevado coste y los datos de eficacia en perros son contradictorios. Así, 13 perros naturalmente infectados con *L. infantum* fueron tratados con AmBisome® y seguidos durante 8 meses (Oliva y cols., 1995). Cuando las dosis totales administradas fueron de 10-15 mg/Kg se produjo una disminución de las

linfadenopatías, esplenomegalia y síntomas cutáneos, pero se produjo recaída a los 4-6 meses, la mayoría de los perros no consiguió alcanzar cura parasitológica total y en casi todos los ellos los niveles de anticuerpos permanecieron altos en todo el seguimiento.

En un estudio realizado en Italia se trataron 23 perros naturalmente infectados con AmBisome<sup>®</sup> con dosis totales de 5, 10, 12, 15, 18 ó 30 mg/Kg. La respuesta clínica y parasitológica fue en general pobre pero mayor en los grupos que recibieron dosis intermedias que en los grupos que recibieron dosis bajas o altas (Oliva, 2000).

Se estudió también el tratamiento de la leishmaniosis canina con anfotericina B en emulsión lipídica (Intralipid<sup>®</sup>) (Moreno y cols., 1999; Lamothe, 2001). En el primer estudio la recaída se produjo en todos los perros tratados, 5 meses después de la terapia. Sin embargo, en el segundo estudio existió una terapia exitosa en 14 de 17 perros, basada en resultados PCR negativos tomados 1-3 meses después de la terapia. Estos estudios son difíciles de comparar puesto que en el primero, la dosis total empleada era menor y en el segundo el periodo de seguimiento era considerablemente más corto que en otros estudios.

### **3.1.3. Eficacia en ratones.**

En modelo murino se han realizado más estudios con anfotericina B que en cricetos. Por ejemplo, en ratones Balb/c infectados con *L. donovani* se observó que calentando Fungizona<sup>®</sup> a 70° C durante 20 minutos se mejoraba el índice terapéutico de la anfotericina B (Petit y cols., 1999). La máxima dosis tolerada para la Fungizona<sup>®</sup> calentada fue de 2.5 mg/Kg, mientras que para la Fungizona<sup>®</sup> normal fue de 0.5 mg/Kg. Estos autores sugieren que el gran tamaño de los agregados de Fungizona<sup>®</sup> calentada permitiría una captura más eficaz por parte del sistema fagocítico mononuclear para ser transferidos al sitio de la infección con amastigotes.

Por otro lado, se ha mostrado que la anfotericina B no requiere células T para ejercer su acción empleando ratones normales y atímicos en los que se evaluó la eficacia de la anfotericina B, pentamidina y estibogluconato de sodio, después de la infección con *L. donovani*. La anfotericina B produjo una reducción del 89% de parásitos en el hígado de los ratones con timo, siendo esta eficacia similar a la

encontrada en el grupo tratado con el antimonial. La pentamidina solo fue eficaz en los ratones con timo, mientras que la anfotericina B sí fue efectiva en los ratones atímicos consiguiendo un 74% de reducción en hígado (Murray y cols., 1993).

Sin embargo, en ratones Balb/c infectados con *L. donovani*, la administración de anfotericina B junto con la estimulación de la respuesta inmune Th1, mediante la administración de IL-12 exógena, anti-CD40 ó anti-IL-10, constituye una estrategia para el desarrollo de regímenes más económicos en la leishmaniosis visceral (Murray y cols., 2003).

Se han realizado comparaciones entre antimonio de meglumine, anfotericina B convencional y aminosidina en ratones Balb/c infectados con *L. infantum*, sacrificándose los animales a distintos tiempos. En ninguno de los casos el antimonio de meglumine fue eficaz en bazo. Pero el uso de dosis bajas y repetidas de anfotericina B consiguió reducir la carga parasitaria, siendo menos efectiva en hígado en la fase final que 10 días después del tratamiento. Las dosis bajas de aminosidina no fueron eficaces ni en bazo ni en hígado, mientras que las dosis altas fueron efectivas en ambos órganos (Buffet y cols., 1996).

Pero la mayoría de los estudios en modelo murino han sido realizados con formulaciones lipídicas de anfotericina B. Así por ejemplo, en ratones Balb/c infectados con *L. donovani* se observó que dosis de 5 mg/Kg de AmBisome<sup>®</sup> eran suficientes para eliminar más del 99% de los parásitos de hígado, siendo los animales capaces de tolerar dosis de hasta 25 mg/Kg. Sin embargo, con 1 mg/Kg de anfotericina B convencional solo se eliminaron del hígado el 52 y el 42% de los amastigotes, mientras que la misma dosis de AmBisome<sup>®</sup> eliminó el 85%, siendo la infección en bazo menos sensible al tratamiento (Croft y cols., 1991).

Estos datos concuerdan con los de otros autores que observaron, que dosis mayores de AmBisome<sup>®</sup> eran más efectivas y menos tóxicas porque era bien tolerado y podía ser administrado a dosis 50 veces mayores que la anfotericina B convencional (Gangneux y cols., 1996; Yardley y Croft, 2000), y Amphocil<sup>®</sup> y Abelcet<sup>®</sup> a dosis 25 veces mayores (Yardley y Croft, 2000); además, a la dosis de 50 mg/Kg/día de AmBisome<sup>®</sup> existió una completa eliminación de los parásitos, tanto en la fase temprana como en la fase tardía de la enfermedad (Gangneux y cols., 1996). Por otro

lado, AmBisome<sup>®</sup> y Abelcet<sup>®</sup> fueron mucho más efectivos en hígado y bazo en comparación con Glucantime<sup>®</sup>, Intralipid<sup>®</sup> y varios azoles (Gangneux y cols., 1998). Pero en otro caso, aunque AmBisome<sup>®</sup> y Abelcet<sup>®</sup> aclararon los parásitos en todos los órganos en la fase tardía de la enfermedad, 8 semanas después de parar el tratamiento se volvieron a detectar parásitos (Gangneux y cols., 1996).

AmBisome<sup>®</sup> es más eficaz en la fase temprana de multiplicación de *Leishmania*, mientras que los antimoniales son más efectivos en la fase de decrecimiento de la carga parasitaria (Gradoni y cols., 1993).

En el modelo de leishmaniosis cutánea AmBisome<sup>®</sup> y Amphocil<sup>®</sup> llegaron mejor a la dermis que Abelcet<sup>®</sup> (Yardley y Croft, 2000).

También se han ensayado formulaciones alternativas a las lipídicas. Por ejemplo, se diseñó una nueva formulación realizada con un surfactante no iónico (AmB-NIV) y se comparó con las preparaciones ya existentes a dosis de entre 1 y 8 mg/Kg/día (Mullen y cols., 1997). La actividad de Amphocil<sup>®</sup> resultó ser igual que la de AmBisome<sup>®</sup> y estas mayores que las de la nueva formulación, siendo Abelcet<sup>®</sup> la menos eficaz. La Fungizona<sup>®</sup> no se empleó en los estudios de dosis múltiples porque era tóxica a esas dosis. El mismo surfactante iónico también ha sido probado con estibogluconato de sodio como principio activo en comparación con las otras formulaciones lipídicas de anfotericina B en ratones Balb/c infectados con *L. donovani* (Mullen y cols., 1998). En la fase aguda de la enfermedad la eficacia de la nueva formulación fue mayor que la de AmBisome<sup>®</sup>, este igual que Amphocil<sup>®</sup>, y este mayor que Abelcet<sup>®</sup>. En la fase crónica de la enfermedad la eficacia de la nueva formulación también fue mayor que la de AmBisome<sup>®</sup>.

Una formulación de complejos lipídicos (dimiristol fosfatidilcolina y dimiristol fosfatidilglicerol) redujo la actividad hemolítica de la anfotericina B convencional y la toxicidad hacia macrófagos peritoneales murinos; sin embargo, *in vivo* fue menos eficaz que AmBisome<sup>®</sup> frente a *L. donovani* (Larabi y cols., 2003).

En otro caso se comparó otra nueva formulación con Fungizona<sup>®</sup>, en ratones Balb/c infectados con 2 cepas distintas de *L. infantum*. En el grupo infectado con la

cepa 1 no hubo diferencias significativas con alta reducción de la carga para ambas preparaciones, mientras que en el grupo infectado con la cepa 2, la Fungizona<sup>®</sup> consiguió una reducción del 78.9% y la nueva formulación del 98.7% a la dosis de 0.8 mg/Kg (Paul y cols., 1997). Por otro lado, se ensayó un nuevo sistema de liberación denominado biovector iónico anfifílico, compuesto de lípidos aniónicos y una matriz de polisacáridos catiónica que mostró eficacia similar a la de AmBisome<sup>®</sup> en ratones infectados con *L. donovani* (Loiseau y cols., 2002).

Se ha realizado un primer intento de administración de anfotericina B por vía oral en ratones Balb/c infectados con *L. donovani*. Dichos ratones se trataron el día 7 p.i. con una nanosuspensión de anfotericina B por vía oral a la dosis de 5 mg/Kg durante 4-5 días consecutivos, sacrificándose los animales el día 14 p.i. Ni la anfotericina B micronizada, ni AmBisome<sup>®</sup>, ni Fungizona<sup>®</sup> por vía oral redujeron significativamente la carga en hígado, pero la nanosuspensión de anfotericina B produjo una reducción del 28.6% (Kayser y cols., 2003). Sin embargo, estos datos son aun muy preliminares y habría que seguir realizando estudios de administración oral con este principio activo.

#### **3.1.4. Eficacia en cricetos.**

A nivel experimental en modelos animales, han sido pocos los estudios realizados con anfotericina B en cricetos. Así por ejemplo, al tratar cricetos con 1.5-11 mg/Kg de anfotericina B encapsulada en liposomas, se eliminaron el 99% de los parásitos del hígado y bazo, mientras que al tratar monos con 3 dosis de 4 mg/Kg, se eliminaron el 98-99% de los parásitos en hígado y bazo. La anfotericina B en liposomas por lo tanto, resultó ser 170-750 veces más activa que los antimoniales en cricetos y 60 veces más activa en monos (Berman y cols., 1986).

Otro grupo de cricetos fue infectado con *L. donovani*, administrándoseles Amphocil<sup>®</sup> en diferentes dosis (0.1, 0.4, 1.5 y 6.0 mg/Kg), sacrificándose 4 días después. Amphocil<sup>®</sup> resultó ser 15 veces más efectivo que la anfotericina B convencional. En un segundo grupo, el fármaco fue administrado 10 días después de la infección, sacrificándose 2, 7 u 11 días después; en este caso Amphocil<sup>®</sup> resultó ser 4 veces más activo que la anfotericina B convencional. También se observa que Amphocil<sup>®</sup> es menos tóxico que la anfotericina B libre en riñón (Berman y cols., 1992).

Se han ensayado otros tipos de liposomas conteniendo anfotericina B, a parte de los convencionales, por ejemplo, liposomas conteniendo Tuftsin, que es un tetrapéptido activador de macrófagos, en dosis de entre 1.25 y 10 µg/ml los días 15-18 p.i., en cricetos infectados con *L. donovani*. La anfotericina B encapsulada en liposomas con Tuftsin resultó ser más eficaz que la encapsulada en liposomas normales, facilitándose con esta formulación la accesibilidad del principio activo a zonas como la médula ósea, que es inaccesible para el fármaco libre. Además, las dosis múltiples con ambas formulaciones produjeron un alto grado de inhibición en el bazo en comparación con la anfotericina B libre (Agrawal y cols., 2002).

### **3.2. Toxicidad.**

La toxicidad de la Fungizona® y los liposomas de anfotericina B ha sido comparada en ensayos con células epiteliales de riñón en sistemas *in vitro* (Krause y cols., 1974), observándose diferencias marcadas entre la toxicidad aguda y crónica de la anfotericina B liposomal, ya que reduce la toxicidad aguda. La observación de que la asociación de anfotericina B con lípidos disminuye la toxicidad en líneas celulares de riñón y en eritrocitos humanos, también es aplicable a las células del sistema inmune.

Las tres formulaciones lipídicas comerciales tienen dosis letales 50 mayores que la Fungizona®, así, la DL50 de Amphocil® es 18 veces mayor, la de Abelcet® 23 veces mayor y la de AmBisome® 87 veces mayor (Viviani, 1994). Estas formulaciones también tienen menor toxicidad hacia células animales *in vitro* que la Fungizona®.

Ninguna formulación preparada con un detergente o con liposomas ha demostrado ser más terapéutica que la Fungizona®. No se han hecho estudios a gran escala de la eficacia comparativa de distintas formulaciones independientemente con la Fungizona®. En general, las formulaciones de anfotericina B basadas en lípidos son menos tóxicas en animales no infectados que la Fungizona®, y en animales infectados la máxima dosis tolerable, es decir, las dosis máximas que no producen toxicidad aguda, son mayores. Un incremento en la dosis tolerada, sin embargo, no se traduce en un incremento de la DL50. De hecho los animales infectados enfermos son más susceptibles a la toxicidad por anfotericina B que los animales sanos. El incremento en la eficacia se debe a que las formulaciones menos tóxicas pueden ser administradas a dosis mayores (Brajtburg y Bolard, 1996).

Las reacciones adversas en el perro también son debidas a la dosis. Se ha visto que el mecanismo por el que la anfotericina B produce toxicidad es por su unión a lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL), y precisamente los receptores que existen en los mamíferos son para lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (Barwicz y cols., 1991). El efecto tóxico más importante es la nefrotoxicidad y aumentan los niveles de creatinina sérica y el nitrógeno ureico. En el perro las alteraciones glomerulares son debidas a la dosis y son más pronunciadas cuando se administra en *bolus* que cuando se hace lentamente (Rubin y cols., 1989). También existen en perros alteraciones hepáticas (Fielding y cols., 1992; Lamothe, 1997), neurotoxicidad, anemia normocítica y normocrómica, debido a la inhibición de eritropoyetina; leucopenia, trombocitopenia y tromboflebitis. Las formulaciones lipídicas son menos tóxicas porque se unen a lipoproteínas de alta densidad (Brajtburg y Bolard, 1996).

### 3.3. Farmacocinética.

Cuando la anfotericina B llega al torrente sanguíneo se une en su mayor parte a la lipoproteínas plasmáticas (Martindale, 1999). Cuando se administra por vía intravenosa alcanza concentraciones eficaces en el líquido peritoneal, el pleural y el articular (Catalogo de especialidades Farmacéuticas, 2003). Su volumen de distribución es de unos 4 L/Kg y su semivida plasmática es de unas 24 horas, llegando a alcanzar un vida media de 15 días en el organismo. La excreción se realiza por orina y bilis principalmente (US Pharmacopeia Dispensing Information, 1992).

En ensayos experimentales se observó que en todos los grupos de ratones Balb/c infectados con *L. infantum* y tratados con AmBisome<sup>®</sup> se encontraron altos niveles de anfotericina B en hígado y bazo, sobre todo en hígado, disminuyendo lentamente en ambos órganos durante los 15 días después de la última dosis de AmBisome<sup>®</sup> (Gradoni y cols., 1993). Además, se observó que existían más niveles de AmBisome<sup>®</sup> que de anfotericina B convencional en tejido, con niveles detectables 14 semanas después del tratamiento; es decir, que el AmBisome<sup>®</sup> se acumulaba más en tejidos que la forma libre de anfotericina B y esto podía ser debido a que va directamente a macrófagos (Gangneux y cols., 1996).

Con otras formulaciones de anfotericina B también existían muchos más niveles de fármaco en hígado y bazo que con la forma libre (Paul y cols., 1997), permitiéndose una reducción de la toxicidad y la persistencia en tejidos, más que el incremento de actividad. Esto es lo mismo que observan Croft y cols. en 1991 y Gangneux y cols. en 1996, postulando que el acceso de formulaciones liposomales a órganos ricos en macrófagos como la médula ósea, piel, tracto gastrointestinal, etc, es esencial para evitar recaídas.

### **3.4. Efecto inmunomodulador.**

El efecto inmunomodulador de la anfotericina B ha sido reconocido durante muchos años, y su actividad inmunomoduladora, ha sido revisada (Yamaguchi y cols., 1993). Se han estudiado sus efectos inmunoestimuladores sobre linfocitos, monocitos y leucocitos polimorfonucleares así como su efecto en la respuesta del hospedador. Varios trabajos muestran que la anfotericina B a altas concentraciones, que están por encima del máximo nivel sérico obtenido en humanos, inhiben la función de las células B, T y polimorfonucleares (Marmer y cols., 1981; Walls y Key, 1982).

Este aparente efecto supresor sobre estas células puede ser atribuido a su toxicidad y al deoxiglicolato que esta contenido en las preparaciones clínicas intravenosas de Fungizona<sup>®</sup>. Sin embargo, un mayor número de trabajos muestran que la anfotericina tiene un efecto inmunoadyuvante sobre los linfocitos (Nair y Schwartz, 1982; Sarthou y cols., 1986) y un efecto inmunoestimulador en términos de favorecer las funciones del macrófago y células PMN, como la quimiotaxis, fagocitosis, actividad microbida y respuesta quimioluminiscente a concentraciones similares o mas bajas (Perfect y cols., 1987; Gelfand y cols., 1988; Wolf y Massof, 1990). Por ejemplo, se ha visto que la anfotericina B puede estimular los macrófagos murinos para producir niveles marginales de TNF- $\alpha$  (Chia y Pollack. 1989; Chia y McManus. 1990) y que la anfotericina B, al contrario que los azoles, es inmunoestimuladora ya que induce resistencia del hospedador a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* (Yamaguchi y cols., 1993).

Ya que se sabe que la anfotericina B estimula el sistema inmune bajo condiciones apropiadas, se ha sugerido que la anfotericina B podría ser usada profilácticamente contra infecciones fúngicas, por ejemplo, se vio que las células de

*Candida albicans* viables o matadas eran capaces de inducir la producción *in vitro* de TNF- $\alpha$  por los macrófagos y esta actividad era incrementada por la anfotericina B empleada para proteger a los ratones contra la infección sistémica con *Candida albicans* (Vecchiarelli y cols., 1986).

Aunque siempre hay datos conflictivos, parece que la anfotericina B es inmunoestimuladora en un rango de dosis apropiado. También se ha visto que la anfotericina B acrecienta la respuesta inmune en la mayoría de las cepas consanguíneas de ratón (Bolard, 1991).

Si la anfotericina B produce daño celular es debido a la generación de formas reactivas de oxígeno y la capacidad para descomponerlas podría afectar a la resistencia al daño (Brajtburg y cols., 1990). Este razonamiento es sostenido por la evidencia de que anfotericina B estimulaba un mayor estallido respiratorio en los macrófagos de ratones AKR que en los macrófagos de ratones C57BL/6 (que son menos resistentes al daño por anfotericina B). Por el contrario, se ha visto que la anfotericina suprime la respuesta inmune humoral y celular, así como la activación de macrófagos. La simple explicación para este resultado contradictorio es que la toxicidad dosis-dependiente para las células de mamíferos impide la demostración de ningún efecto inmunoestimulador (Brajtburg y Bolard, 1996).

También se ha visto que la proliferación de células T era menos inhibida por anfotericina B incorporada en liposomas que por Fungizona<sup>®</sup> (Boggs y cols., 1991). Así mismo, Abelcet<sup>®</sup> estimula la actividad oxidativa y la expresión de integrinas de los neutrófilos polimorfonucleares en mayor grado que Fungizona<sup>®</sup> y Abelcet<sup>®</sup> era más efectivo disminuyendo la movilidad de neutrófilos polimorfonucleares. Sin embargo, cuando se comparan con Fungizona<sup>®</sup>, los complejos lipídicos disminuyen la activación de los neutrófilos polimorfonucleares humanos (Sullivan y cols., 1992). Concentraciones muy altas de Fungizona<sup>®</sup> inhiben la proliferación de los esplenocitos de ratón, mientras que altas concentraciones de AmBisome<sup>®</sup> no tienen efecto. Como AmBisome<sup>®</sup> no tiene efecto en la actividad inmunológica de los esplenocitos y podrían no deprimir más un sistema inmune ya deprimido, podría ser una buena terapia en aquellos pacientes inmunodeprimidos (Schindler y cols., 1993). La ausencia de efecto en las células del sistema inmune del AmBisome<sup>®</sup>, a altas concentraciones, podría explicar el descenso de los fenómenos tóxicos observados *in vivo*.

### ***Revisión bibliográfica***

Sin embargo, otros autores postulan que el efecto inmunomodulador de anfotericina B no parece jugar un papel importante en la actividad antileishmania de este compuesto (Escobar, 2001).

# ***Objetivos***

## **OBJETIVOS.**

Este trabajo tiene como objetivo principal la valoración de nuevas formulaciones de anfotericina B frente a la leishmaniosis visceral en un modelo de experimentación animal.

Los objetivos concretos son:

- 1. El establecimiento de un modelo de experimentación animal para la leishmaniosis visceral que permita fijar las condiciones óptimas para su aplicación a la valoración de la eficacia de nuevas formulaciones de anfotericina B.**
- 2. La valoración de la eficacia parasitológica de nuevas formulaciones de anfotericina B, mediante el ensayo de distintas pautas de tratamiento, distintos estados de agregación de la anfotericina B, distintos polímeros de encapsulación y distintas dosis de principio activo.**
- 3. Evaluación de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, después del tratamiento con las distintas formulaciones, de manera que se pueda realizar un seguimiento de la evolución del tratamiento a nivel inmunológico.**
- 4. Puesta a punto de nuevas técnicas de Biología Molecular para la determinación de parámetros inmunológicos como la expresión génica de citoquinas y para el recuento de parásitos en nuestro modelo experimental.**

# ***Material y métodos***

## MATERIAL Y METODOS.

### 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Tanto para el mantenimiento del parásito, como para las pruebas de eficacia e inmunológicas, se utilizaron lotes homogéneos de cricetos (*Mesocricetus auratus*) machos, de 60 - 70 g de peso (Harlan Ibérica S.A.).



Así mismo, para los estudios en modelo murino se emplearon lotes homogéneos de ratones BALB/c machos, de 6 a 8 semanas de edad (Harlan Ibérica S.A.).

Todos ellos estuvieron alojados en jaulas Macrolón PANLAB-100, en estancias con temperatura, humedad y luz controladas.

### 2. CEPAS DE *Leishmania*.

En todas las infecciones experimentales se emplearon promastigotes de la cepa **M/CAN/ES/96/BCN150** (zimodema MON-1) de *L. infantum*, aislada de un perro en Cáceres, que fue cedida cortésmente por los Profesores José María Requena y Carlos Alonso (Laboratorio de Parasitología Molecular, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid).

Paralelamente, se realizaron también ensayos de mantenimiento en criceto, con la cepa **M/CAN/ES/92/BCN83** (zimodema MON-1) de *L. infantum*, amablemente

## **Material y métodos**

cedida por la Profesora Montserrat Portús (Laboratorio de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona).

Para la obtención del antígeno (extracto bruto salino) utilizado en las distintas pruebas inmunológicas, se emplearon promastigotes de la cepa **MHOM/Fr/78/LEM75** de *L. infantum*, procedente de Montpellier, proporcionada amablemente por el Profesor José María Alunda (Departamento de Patología Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid). Además, en los ensayos de linfoproliferación *in vitro* también se empleó antígeno de la cepa M/CAN/ES/96/BCN150.

### **3. CULTIVO Y RECuento DE PROMASTIGOTES PARA INFECCION.**

Se emplearon promastigotes de “reciente aislamiento” (cuatro pases en cultivo desde su transformación a partir de amastigotes) de la cepa BCN150 en fase estacionaria de 7 días, mantenidos a 26° C en medio C-199. Los recuentos se realizaron en cámara de Neubauer, a la dilución 1/100 con un 2% de formol.

Se realizaron los cálculos necesarios en función del número de animales que se iban a infectar y de la dosis infectante a administrar, teniendo en cuenta que el volumen de inóculo a inyectar era de 0.2 ml/animal. Una vez determinado el volumen de cultivo necesario, se realizó un primer lavado a 2500 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C en su propio medio. Posteriormente, se hizo un segundo lavado a 2500 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C en PBS. Finalmente, el pellet se resuspendió en el volumen fijo de PBS frío que se había calculado previamente y se mantuvo en hielo durante todo el tiempo que duró la infección.

### **4. INFECCIONES EXPERIMENTALES.**

Se empleó como anestésico una solución acuosa de uretano (Sigma) al 15%, de la que se administró un volumen de 0.2 ml/animal. Las infecciones se realizaron por vía intracardiaca, empleando jeringas de insulina (Novico S.p.A.), introduciendo con mucho cuidado la aguja por debajo del esternón, de manera que se formara un ángulo de 45° entre la jeringa y el cuerpo del animal. Esta técnica requiere mucha destreza y habilidad, porque los animales pueden morir durante el proceso y fue realizada por la

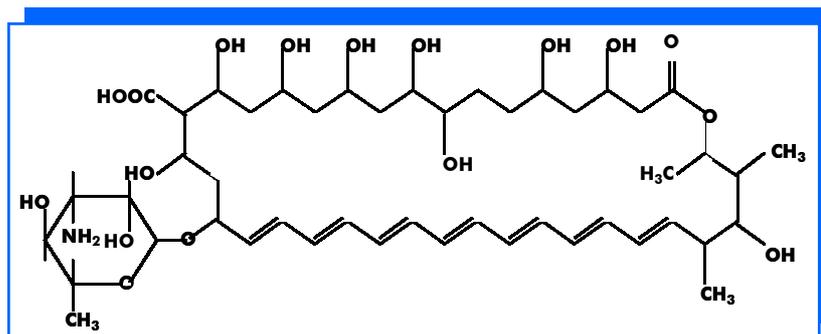
Dra. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea Ayuela del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

En las pruebas de modelo de infección en criceto se emplearon dosis de  $10^5$  y  $10^7$  promastigotes por criceto, mientras que en las pruebas de modelo en ratón se emplearon dosis de  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  promastigotes por ratón. En todas las pruebas de eficacia e inmunológicas se empleó una dosis de infección de  $10^7$  promastigotes por criceto.

## 5. PRINCIPIO ACTIVO Y POLIMEROS EMPLEADOS EN LAS DISTINTAS FORMULACIONES GALENICAS ENSAYADAS.

Tanto el principio activo como los distintos polímeros empleados para la encapsulación del mismo, fueron proporcionados 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.

El principio activo empleado en todas las pruebas fue la **Anfotericina B** (anfotericina B-2 micronizada, pureza del 93%, proporcionada por Squibb Industria Farmacéutica S.A.), en sus distintos estados de agregación: **dimérico**, **monomérico** y **poliagregado**.



*Estructura química de la anfotericina B.*

La anfotericina B en estado de agregación dimérico, que es considerada un símil de la especialidad farmacéutica comercial (Fungizona<sup>®</sup>), fue elaborada mediante la disolución de deoxicolato de sodio en agua, posterior alcalinización con hidróxido

## Material y métodos

sódico hasta pH 12, adición de anfotericina B hasta completa disolución y neutralización final a pH 7.4 con ácido ortofosfórico.

En algunas pruebas también se empleó Fungizona endovenosa<sup>®</sup> (Squibb Industria Farmacéutica S.A.).

Los distintos polímeros empleados para la microencapsulación de la anfotericina B fueron los siguientes:

- **Albúmina sérica humana (Human Seric Albumin: HSA)** (Solución de albúmina humana al 20% Behring inyectable<sup>®</sup>. Aventis Behring).
- **Acido poli(láctico co-glicólico) Resomer<sup>®</sup> RG-502 (PLGA RG-502)** (Boehringer Ingelheim Pharma K.G.).
- **Acido poli(láctico co-glicólico) Resomer<sup>®</sup> RG-503 (PLGA RG-503)** (Boehringer Ingelheim Pharma K.G.).

En todos los casos las formulaciones fueron administradas por vía intracardiaca en un volumen de 0.2 ml/criceto.

## 6. REACTIVOS GENERALES.

### PBS 10X

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Panreac) 2,5 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Panreac) 22,4 g

Disolver en 500 ml de agua destilada y ajustar a pH: 7,2-7,4.

ClNa (Panreac) 87,6 g

Enrasar a 1 L. Diluir a 1/10 antes de usar, resultando un tampón final fosfato 0.01 M y ClNa 0.15 M.

### PBS-Glucosa-EDTA

EDTA disódico (Probus) 2 mM 0.744 g

Glucosa (Panreac) 50 mM 9.008 g

PBS 1X c.s.p. 1L

## 7. REACTIVOS PARA ELISA.

**Tampón Carbonato-Bicarbonato**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Merck)	3.2 g
NaHCO <sub>3</sub> (Merck)	5.9 g
Agua destilada	c.s.p. 1L
Ajustar a pH 9.6	

**PBS - Tween (0.05%)**

Tween 20 (Panreac)	0.5 ml
PBS pH 7.2-7.4	c.s.p. 1 L

**BSA al 5%**

BSA (Fracción V - Sigma)	5 g
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

**BSA al 0.1 % en PBS**

BSA al 5 %	1 ml
PBS - Tween	c.s.p. 50 ml

**Tampón Citrato-Fosfato**

Citrato 0.1 M	100 ml
Fosfato 0.2 M	100 ml
Agua destilada	c.s.p. 400 ml
Ajustar a pH 5, con HCl	

Citrato 0.1 M:

Citrato sódico (Panreac)	21 g
Agua destilada	c.s.p. 1L

Fosfato 0.2 M:

Fosfato disódico hidratado (Panreac)	35.6 g
Agua destilada	c.s.p. 1L

**Sustrato**

O-fenileno-diamina (OPD) (Sigma)	40 mg
Tampón citrato-fosfato	100 ml

Disolver el OPD en el tampón y en el momento de su uso, añadir un 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Panreac) manteniendo la mezcla en oscuridad.

## Material y métodos

### **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac)	80 ml
Agua destilada	c.s.p. 500 ml

### **Conjugados marcados con peroxidasa**

Inmunoglobulina de cabra anti-ratón IgG1 (Caltag)
Inmunoglobulina de cabra anti-ratón IgG2a (Caltag)
Inmunoglobulina de cabra anti-ratón IgG3 (Caltag)
Inmunoglobulina de cabra anti-ratón IgM (Caltag)
Inmunoglobulina de conejo anti-criceto IgG: HRPO (Oxford Biotechnology)

## **8. REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.**

### **Acril/bisacrilamida (30 : 0.8)**

Acrilamida (BioProbe)	30 g
Bisacrilamida (BioRad)	0.8 g

Llevar hasta 100 ml con agua destilada, filtrar con papel Whatman nº 1 y almacenar en oscuridad a 4° C.

### **“Resolving” (3M Tris - HCl, pH 8.8)**

Tris (Merck)	36.3 g
HCl 1 M	48 ml
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl 1 N, filtrar con papel Whatman nº 1 y almacenar en oscuridad a 4° C.

### **“Stacking” (0.5 M Tris - HCl, pH 6.8)**

Tris (Merck)	6 g
HCl 1 M	48 ml
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

Ajustar a pH 6.8 con HCl 1 N, filtrar con papel Whatman nº 1 y almacenar en oscuridad a 4° C.

**Tampón de muestra**

Agua destilada	1.2 ml
Stacking	1 ml
Glicerol (Merck)	4.6 ml
SDS (Sigma) 10%	0.8 ml
Azul de Bromofenol (Merck) 0.05% (p/v)	0.2 ml

**SDS al 10%**

SDS	10 g
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

**Persulfato amónico al 1.5%**

Persulfato amónico (Merck)	1.5 g
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

**Tampón de cubeta (Reservoir Buffer) pH 8.3**

Tris (0.25 M)	30.3 g
Glicina (BioRad)	144.0 g
SDS	10.0 g
Agua destilada	c.s.p. 1L

**Marcadores de Peso Molecular para electroforesis de proteínas**

Preteñidos de amplio rango (6.700-208.000 Da, Bio-Rad).

**9. REACTIVOS PARA WESTERN-BLOT.**

**Tampón de electrotransferencia**

Glicina (39 mM)	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 (Nestlé)	5 g
PBS	c.s.p. 100 ml

**Solución de revelado**

Solución A:

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6 µl
PBS	10 ml

Solución B:

4-cloro-1-naftol (Sigma)	0.03 g
Metanol	10 ml

Añadir la solución B sobre la A en oscuridad.

**10. REACTIVOS PARA CITOMETRIA DE FLUJO.**

**Cloruro amónico al 0.8 %**

CINH <sub>4</sub> (Panreac)	0.8 g
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

**p - formaldehído al 0.2 %**

p - formaldehído	0.2 g
PBS 1X pH 7.2 - 7.4	c.s.p. 100 ml

Calentar a 60° C en campana, añadiendo NaOH hasta obtener una solución transparente.

**Anticuerpos monoclonales**

- Anticuerpo monoclonal anti-CD4 (L3T4) de ratón conjugado con R-Ficoeritrina (R-PE) (PharMingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD19 de ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceina (PharMingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD8 de ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceina (PharMingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-TCR β de ratón conjugado con R-Ficoeritrina (R-PE) (PharMingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-TCR γδ de ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceina (PharMingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD45 (LCA-Ly) de ratón conjugado con Cykron (PharMingen).

## 11. REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DE INMUNOCOMPLEJOS EN RIÑON.

### Tampón Citrato 0.02 M pH 3.5

Acido cítrico	3.84 g
Agua destilada	c.s.p. 1L
El pH se ajusta a 3.5 con Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	

### Tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	358 g
Agua destilada	c.s.p. 1L

## 12. REACTIVOS PARA PCR.

### Tampón para geles de agarosa, Tris-Acetato (TAE) 50X

Tris base	242 g
Acido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M	100 ml
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

Ajustar a pH 8. Este tampón se emplea diluido 1x tanto en la mezcla del gel de agarosa, como en el tanque de electroforesis.

### EDTA 0.5 M

EDTA	16.8 g
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

### Tampón de muestra

Azul de bromofenol 0.25%  
Sacarosa (Panreac) 40% p/v en agua destilada  
Conservar a -20° C.

### Polimerasas

AmpliTa<sup>®</sup> Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems).

SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

En ambas polimerasas ya están incorporadas todos los reactivos necesarios para realizar la PCR, excepto los cebadores, el agua y el material genético, es decir, en ambas mezclas ya están incluidos los desoxinucleótidos (dNTPs), el cloruro magnésico y el tampón Tris-HCl correspondiente, a las concentraciones

## **Material y métodos**

adecuadas. Ambas polimerasas fueron empleadas en las cantidades recomendadas por la casa comercial.

### **Marcadores de Peso Molecular**

De rango 80-1000 Kb (BioTools).

## **13. MEDIOS DE CULTIVO.**

**13.1. 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.

**13.2. Medio de cultivo Schneider's (Sigma):** adicionado de hepes 4 g/L, bicarbonato 0.4 g/L, penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml y SBF 10%, ajustándose el pH a 6.7 y posterior esterilización mediante filtración por membrana de 0.22 µm.

**13.3. Medio de cultivo NNN (Novy-Nicole-McNeal):** 8 g de base de agar sangre (Hispanlab), c.s.p. 200 ml de agua destilada. La base de agar se disolvió en agua hirviendo y la solución se esterilizó en autoclave. Posteriormente se dejó enfriar hasta 60° C y se añadió la sangre desfibrinada de conejo (30 ml de sangre desfibrinada de conejo por cada 70 ml de agar). El medio así obtenido, se añadió bien a placas de 96 pocillos (Sarsted) o bien, a tubos (Dismalab) de 25 ml estériles.

Se añadieron 50 : l de dicho medio a cada pocillo de forma que al solidificar, en la placa inclinada, quedara una ventana que permitiera la posterior visualización de los parásitos. Los tubos se prepararon añadiendo el medio NNN y dejándolos semitumbados para que el medio solidificara en forma de pico de flauta. Una vez solidificado el medio, se dejaron una noche a temperatura ambiente para que se formara el líquido de condensación necesario para la transformación de los amastigotes a promastigotes.



*Placa de NNN de 96 pocillos.*

**13.4. Preparación de sangre desfibrinada de conejo:** Se lavaron perlas de vidrio (3-5 mm) durante una noche en una solución de HCl 1 M y al día siguiente se limpiaron con alcohol de 70° y agua destilada y se secaron con una gasa. Posteriormente se repartieron (3-5 g) en botellas de vidrio de 100 ml y se esterilizaron en autoclave. Cada botella servía para desfibrinar 5-10 ml de sangre.

La sangre, extraída de la vena marginal de la oreja del conejo en condiciones estériles, se añadió a las botellas y se mezcló por inversión hasta que se formó el coágulo (5-10 minutos). A continuación se repartió en tubos estériles de 25 ml y se incubó a 49° C durante 15 minutos con el fin de inactivar el complemento. Finalmente se añadieron los antibióticos (200 UI de penicilina, 200 µg de gentamicina (Acofarma) y 2 mg de estreptomina por ml de sangre) y se almacenó a 4° C hasta su uso.

**13.5. RPMI-1640 10% SBF:** adicionado de L-glutamina 2 mM, Hepes 5 g/L, bicarbonato sódico 2.2 g/L y gentamicina 50 µg/ml; ajustándose el pH a 7.2-7.4 y posterior esterilización mediante filtración por membrana de 0.22 µm.

#### **14. PESOS DE LOS ANIMALES Y DE LOS ORGANOS.**

En la mayoría de los experimentos los animales fueron pesados quincenalmente para determinar si existía una recuperación del peso en aquellos lotes tratados con las formulaciones galénicas. Así mismo, los órganos, bazo e hígado, fueron pesados en el momento de su extracción con el fin de comprobar si había una disminución de la hepatoesplenomegalia en los animales tratados y, porque también era necesario conocer el peso para posteriormente realizar los cálculos para determinar la carga parasitaria.

## **15. OBTENCION DE AMASTIGOTES DE TEJIDOS Y TRANSFORMACION A PROMASTIGOTES.**

Los órganos, bazo o hígado, fueron homogeneizados, en condiciones estériles, sobre una rejilla metálica empleando PBS-Glucosa-EDTA frío. Los restos celulares se eliminaron haciendo pasar el homogenado a través de una columna de lana de vidrio estéril. La solución obtenida se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y 4° C. Posteriormente se eliminaron los sobrenadantes y los “pellets” fueron resuspendidos en 3-4 ml medio C-199; dicha suspensión se repartió en varios tubos de NNN, mezclándose bien con el líquido de condensación de los mismos. Después se incubaron durante 2-3 días a 26° C, momento en el cual los promastigotes ya eran visibles. Dichos promastigotes fueron transferidos a frascos de cultivo estériles que contenían medio líquido C-199 para su posterior multiplicación también a 26° C.

## **16. DETERMINACION DE LA CARGA PARASITARIA EN BAZO E HIGADO.**

Se llevó a cabo mediante el método de la Dilución Límite (Hill y cols., 1983; Titus y cols., 1985). Una vez sacrificados los animales y tras pesar los órganos (bazo e hígado), se pesó una muestra de los mismos que fue homogenizada, en condiciones estériles, sobre una rejilla metálica, empleando PBS-Glucosa-EDTA frío. Los restos celulares se eliminaron haciendo pasar el homogenado a través de una columna de lana de vidrio estéril. La solución obtenida se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y 4° C. Posteriormente se eliminaron los sobrenadantes y los “pellets” fueron resuspendidos en un volumen fijo de medio C-199.

A las placas de NNN previamente se les había añadido 100 : l de medio C-199 por pocillo, excepto en el primer pocillo de forma que a éste se le añadieron 200 : l de la muestra. Desde este pocillo y a continuación, se fueron pasando 100 : l hasta el último pocillo, es decir, se realizó una dilución en base 2.

Las placas se incubaron durante 10 días a 28° C, momento en el que se procedió a la visualización del número de pocillos positivos. Se asume que los amastigotes se han ido diluyendo de tal manera que en el último pocillo positivo la dilución es máxima, es decir, queda un solo amastigote. Los promastigotes que crecen en ese pocillo provienen de ese único amastigote. Si eso es cierto, la carga parasitaria

inicial de ese pocillo fue 1. Como la muestra estaba diluida tendremos que multiplicar por 2, es decir, que en el último pocillo positivo se considera que la carga parasitaria es 2. En el anterior es 4, en el anterior a este, es 8, y así sucesivamente. Así, mediante una tabla de transformación se obtiene el número de parásitos contenido en cada muestra y tras una serie de cálculos se deduce el número de parásitos por miligramo de órgano.

<b>Pocillos positivos</b>	<b>Nº de parásitos</b>
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024

## **17. OBTENCION DEL ANTIGENO (Extracto bruto salino).**

Se emplearon promastigotes en fase estacionaria (día 7 post-inóculo) de *L. infantum* de la cepa LEM75 o de la cepa 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 (dr. 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.

## **18. VALORACION DE PROTEINAS POR EL METODO BRADFORD.**

La concentración proteica, en todos los casos, se determinó mediante el método de Bradford (1976), empleando una solución colorante de Bio-Rad (Richmond,

## Material y métodos

CA, USA) y siguiendo el procedimiento de microensayo que permite detectar concentraciones entre 5-250 µg/ml. Para ello, se realizó una curva patrón proteica (albúmina sérica bovina: BSA) a partir de una solución madre de concentración 1 mg/ml, siguiendo la siguiente pauta:

<b>Solución de BSA</b>	<b>PBS</b>	<b>Reactivo Bradford</b>
2 µl	798 µl	200 µl
4 µl	796 µl	200 µl
8 µl	792 µl	200 µl
12 µl	788 µl	200 µl
16 µl	784 µl	200 µl
20 µl	780 µl	200 µl
Blanco	800 µl	200 µl

Se realizaron distintas diluciones de la muestra problema en las mismas condiciones 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).

## 19. OBTENCION DE SUEROS.

Los animales fueron sangrados a partir del plexo retro-orbital, semanalmente. Tras la coagulación de la sangre, se realizaron dos centrifugaciones sucesivas durante 10 minutos a 3000 r.p.m. para la obtención de los sueros, que fueron almacenados a – 20° C hasta el momento de su uso.

## 20. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS.

La determinación cuantitativa de los niveles de anticuerpos se realizó mediante la técnica de ELISA INDIRECTO, consistente en las siguientes etapas:

- Fijación del antígeno: Se realizó sobre placas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano Polysorp Surcace (Nunc Brand Products), durante una noche a 4° C. Para ello, se diluyó el antígeno en tampón carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6, hasta la concentración final deseada (en este caso 2.5 µg/ml). De esta

solución se añadieron 100 µl a cada pocillo. Tras este período, se procedió al lavado de las placas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, para eliminar aquellos antígenos no fijados o mal fijados.

- Postapizado: Se añadieron 200 µl por pocillo de una solución de BSA al 0.1 % en PBS y se dejó en incubación durante una hora a 37° C. Durante ese periodo de incubación se tapizan perfectamente las zonas que no han sido recubiertas por el antígeno, evitando así adsorciones inespecíficas de las inmunoglobulinas. Después se lavaron las placas de la misma manera que en el apartado anterior.
- Adición de los sueros: Se añadieron 100 µl por pocillo, de los sueros a la dilución adecuada, en cada caso, en PBS-Tween 20-BSA al 0.1%, y se dejaron en incubación durante dos horas a 37° C. Posteriormente, se lavaron las placas igual que siempre para eliminar los anticuerpos que no habían reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con peroxidasa, diluidos en PBS-Tween 20-BSA al 0.1%: Se añadieron 100 µl por pocillo, a la concentración indicada por la casa comercial, y se dejaron en incubación durante una hora a 37° C. Después se lavaron las placas tres veces en PBS-Tween 20, para eliminar el conjugado que no había reaccionado.
- Adición del sustrato (OPD): Se añadieron 100 µl por pocillo, dejándose actuar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que los controles negativos empezaron a adquirir color.
- Frenado de la reacción: Mediante la adición de 50 µl por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N.
- Lectura de las densidades ópticas: A 492 nm en un espectrofotómetro Elx800 (Bio-Tek Instruments Inc, USA).
- Simultáneamente se dispusieron pocillos control sin antígeno para comprobar que la reacción colorimétrica era debida a la formación del complejo antígeno-anticuerpo y no a reacciones inespecíficas.

## **21. 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 II de Bio-Rad y con una fuente de alimentación de Pharmacia LKB ECPSN 3000/150, 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", que en este caso era en gradiente 5-20 %. La composición de los geles era la siguiente:

**Gel de separación o "Resolving" en gradiente 5-20 %**

<b>COMPOSICION</b>	<b>20 %</b>	<b>5 %</b>
<i>Bis-acrilamida (30 : 0.8)</i>	1.333 ml	0.333 ml
<i>3M Tris-ClH, pH 8.8</i>	0.25 ml	0.25 ml
<i>SDS 10%</i>	20 µl	20 µl
<i>Persulfato amónico 1.5 %</i>	100 µl	100 µl
<i>TEMED (Sigma)</i>	2.1 µl	2.1 µl
<i>Agua destilada</i>	0.297 ml	1.297

Se prepararon por separado las soluciones de cada concentración y una vez añadidos el persulfato amónico y el TEMED, que actuaban como catalizadores de la reacción de polimerización, se dispusieron en un sistema de vasos comunicantes, de forma que se creó un gradiente de concentración al caer entre el sistema de cristales previamente nivelado. A continuación, y con el fin de que el frente quedara horizontal se añadieron 1 ó 2 ml de agua destilada. Se dejó polimerizar durante 20 minutos a temperatura ambiente, eliminándose finalmente el agua con un papel de filtro.

**Gel de concentración o "Stacking" al 4%**

<b>COMPOSICION</b>	<b>VOLUMEN</b>
<i>Bis-acrilaminda (30 : 0.8)</i>	0.25 ml
<i>0.5 M Tris-ClH, pH: 6.8</i>	0.50 ml
<i>SDS 10%</i>	20 µl
<i>Persulfato amónico 1.5%</i>	100 µl
<i>TEMED</i>	2.8 µl
<i>Agua destilada</i>	1.130 ml

Antes de añadir el gel "Stacking" se colocaron los peines adecuados y se añadió el gel, dejándose polimerizar durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se extrajo el peine y se limpiaron los restos de gel con papel de filtro.

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.

## **22. DETECCION DE ANTIGENOS POR WESTERN-BLOT.**

Las muestras de antígeno (200  $\mu$ g) se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE en gradiente 5-20%, en condiciones reductoras. A continuación, se transfirieron electroforéticamente a papel de nitrocelulosa de 0.2  $\mu$ m de poro (Amersham Biosciences) 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 (Pharmacia).

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, leche descremada al 1% y Tritón X-100 al 0.1%, 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 correspondiente en PBS-Tween 20, leche descremada al 1% y Tritón X-100 al 0.1 %, 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 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.

### **23. OBTENCION DE LINFOCITOS ESPLENICOS.**

Para la obtención de linfocitos a partir de bazo, éstos se trituraron sobre una rejilla metálica de 40 µm, mediante el émbolo de una jeringuilla, en condiciones estériles. Se añadieron unos mililitros de medio de cultivo RPMI estéril con 10% SBF, pH 7.2-7.4 sobre la rejilla, recogién dose a continuación en un tubo de unos 30 ml, evitando recoger restos de tejido. Seguidamente, la suspensión de linfocitos en RPMI se sometió a centrifugación a 1500 r.p.m., durante 5 minutos, tras lo cual se eliminó el sobrenadante. Se sometió a un segundo lavado con unos 5-6 ml de RPMI estéril y se le añadió 1 ml de cloruro amónico (NH<sub>4</sub>Cl) al 0.8 % estéril, con el fin de lisar los glóbulos rojos. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se sometió a un último lavado, añadiendo 5-6 ml de RPMI, seguido de centrifugación a 1500 r.p.m., 5 minutos. Tras este último lavado el "pellet" se resuspendió en un volumen fijo de RPMI para proceder al recuento de linfocitos. El recuento se realizó en cámara Neubauer, determinándose la viabilidad con el colorante vital Azul Tripán.

### **24. DETERMINACION DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.**

Se preparó una suspensión de linfocitos a partir de bazo. Para cada uno de los animales se emplearon 10<sup>6</sup> células que se resuspendieron en 20 µl de RPMI con 10% SBF, añadiéndose a continuación los correspondientes anticuerpos monoclonales\* a la dilución recomendada por la casa comercial, dejándose en incubación 30 minutos, en hielo y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con 1 ml de PBS. Finalmente, se resuspendieron en 400 µl de una solución al 0.2% de p-formaldehído-PBS, para fijar las células, procediéndose al día siguiente a la determinación de las subpoblaciones mediante citometría de flujo.

*\* Dada la escasez de reactivos inmunológicos para criceto, fue necesario recurrir al empleo de anticuerpos monoclonales frente a receptores de superficie de linfocitos murinos y humanos, de forma que los únicos que presentaron reacción cruzada con linfocitos de criceto fueron los marcadores CD4+ murinos.*

## 25. ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACION “IN VITRO”.

La suspensión de células esplénicas se ajustó a una concentración de  $10^6$  células/ml, dispensándose en placas de cultivo de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron los mitógenos y los antígenos a las concentraciones adecuadas. Las placas se incubaron a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 72 horas. La medida de la proliferación celular se llevo a cabo mediante incorporación de [H]<sup>3</sup>-Timidina y posterior lectura en un contador de centelleo líquido, expresándose los resultados mediante el índice de estimulación (IE).

$$IE = \frac{\text{cpm células + sustancia;}}{\text{cpm células solas}} \quad \text{cpm : cuentas por minuto.}$$

### **Mitógenos:**

Concanavalina A (Biochrom AG), 5 mg/ml

Fitohemaglutinina (Sigma), 15 mg/ml

### **Antígenos:**

BCN150, 25 mg/ml

LEM75, 25 mg/ml

## 26. DETERMINACION DE INMUNOCOMPLEJOS EN RIÑÓN DE CRICETO.

Se realizó siguiendo el método descrito por Sartori y cols. (1991) y mejorado por Requena y cols. (2000). Se tomó uno de los riñones y se homogeneizó en 10 ml de PBS frío. Posteriormente, se lavó el homogenado tres veces con PBS por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 10 minutos en tubos Falcon de 30 ml. Después se resuspendió el pellet en 4 ml de tampón citrato 0.02 M, pH 3.5 y se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, se pasaron a tubos de 10 ml y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 r.p.m. Tras recoger el sobrenadante se ajustó a pH 7 con Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac) 1 M. Las alícuotas fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.

Para la realización de los ELISAs, se tapizaron las placas con 100 µl de las preparaciones anteriores a la dilución 1:50 en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6. Para el tapizado se dejaron 2 horas a 37° C o una noche a 4° C. Tras ese paso, se

postapizaron con BSA al 0.1% en PBS durante 1 hora a 37° C. Posteriormente, se incubaron con el conjugado de conejo anti-criceto marcado con peroxidasa durante 2 horas a 37° C. Finalmente se procedió al revelado siguiendo el mismo procedimiento que para un ELISA normal (apartado 20).

## **27. DETERMINACION DE LA EXPRESION DE CITOQUINAS EN LINFOCITOS ESPLENICOS DE CRICETO MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.**

Debido a la inexistencia de reactivos inmunológicos para la determinación de citoquinas en criceto, fue necesario recurrir al empleo de técnicas de Biología Molecular. Para ello, se empleó la técnica de **RT-PCR cuantitativa a tiempo real**, utilizando el reactivo comercial **SYBR® Green I Dye** (Applied Biosystems), que actúa como el Bromuro de Etidio pero no es intercalante y es 5 veces más sensible que él. La detección directa del producto de PCR es monitorizada midiendo el incremento de fluorescencia causado por la unión del SYBR Green Dye a la doble cadena del DNA. Se define así **Ct** como el primer ciclo de amplificación donde se detecta la señal y es en esa zona donde se realiza la cuantificación. Este reactivo está diseñado para su uso en el **ABI Prism® 7700 Sequence Detection System** (Applied Biosystems) del centro de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

Para determinar la expresión de citoquinas fue necesaria la extracción del RNA mensajero a partir de  $20 \times 10^6$  linfocitos de bazo de criceto, y para ello se empleó un kit de extracción siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Quick Prep™ Micro mRNA Purification Kit, Amersham Biosciences). Posteriormente, el RNAm se valoró en cubeta de cuarzo en el espectrofotómetro a 260 nm para proceder al paso de RT o Transcripción Reversa, es decir, a la transformación del RNAm (150 ng) en cDNA, mediante otro kit, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (First Strand cDNA synthesis kit, Amersham Biosciences). Las muestras de cDNA así obtenidas fueron almacenadas a - 80° C hasta su uso.

Para poder realizar una comparación de la expresión de citoquinas entre los distintos lotes, fue necesario realizar una PCR cuantitativa con una curva patrón de DNA genómico de criceto. Para la extracción de dicho DNA genómico a partir de

linfocitos de bazo, se empleó un kit comercial (G NOME<sup>®</sup> DNA KIT, BIO 101) y el DNA así extraído fue almacenado a -20° C hasta su uso.

Antes de proceder a realizar la PCR cuantitativa fue necesario poner a punto las condiciones de trabajo (cebadores, temperaturas, ciclos, etc). Para ello se empleó un termociclador (MiniCycler<sup>™</sup>, MJ Research) y los productos de amplificación se sometieron a electroforesis a 80 V en geles de agarosa al 3% y posteriormente fueron visualizados a la luz ultravioleta, empleando Bromuro de Etidio como agente intercalante. La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl empleando 12.5 µl de AmpliTaq<sup>®</sup> Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 ó 2.5 µl de DNA o de cDNA y los cebadores a una concentración final de 300 nM.

Un requisito muy importante a la hora de realizar una PCR cuantitativa a tiempo real es que exista un solo producto de amplificación y a ser posible que sea de tamaño pequeño. El diseño de los cebadores se realizó a partir de las secuencias cDNA para cada citoquina publicadas en el GeneBank por Melby y cols. en 1998, de manera que el tamaño de los productos de amplificación fuera pequeño, asegurándonos también así la obtención de un producto único (números de acceso para las secuencias cDNA en el GeneBank: **HPRT (gen control):** AF047041, **IL-4:** AF046213, **IFN-γ:** AF034482, **TGF-β:** AF046214. Para ello utilizamos un software del Centro de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid denominado **Primer Express** (Applied Biosystems). Dicho programa ha sido creado específicamente para PCR cuantitativa y proporciona 200 posibles parejas de cebadores para cada citoquina, de entre las que se eligió la óptima. Las secuencias de los cebadores en este caso fueron las siguientes:

<b>HPRT</b>	<b>Forward</b>	<b>5' AGATCCACTCCCATAACTGTAGATTTTAT-3'</b>
	<b>Reverse</b>	<b>5'-CATCCGCACCATTAATTTTAAAGTC-3'</b>
<b>IL-4</b>	<b>Forward</b>	<b>5'-CCACGGAGAAAGACCTCATCTG-3'</b>
	<b>Reverse</b>	<b>5'-GGGTCACCTCATGTTGGAAATAA-3'</b>
<b>IFN-γ</b>	<b>Forward</b>	<b>5'-GGCCATCCAGAGGAGCATAG-3'</b>
	<b>Reverse</b>	<b>5'-CCATGCTGCTGTTGAAGAAGTTAG-3'</b>
<b>TGF-β</b>	<b>Forward</b>	<b>5'-GCGGCAGCTGTACATCGA-3'</b>
	<b>Reverse</b>	<b>5'-GGCTCGTGAATCCACTTCCA-3'</b>

## Material y métodos

**Condiciones de la PCR:** Para los genes HPRT, IL-4 e IFN- $\gamma$  las condiciones de la PCR fueron: 95° C 10 minutos, 40 ciclos de 95° C 1 minuto, 56° C 1 minuto y 70° C 1 minuto, 72° C 7 minutos. Para el TGF- $\beta$  la condiciones fueron las mismas excepto la temperatura de anillamiento que fue de 60° C en vez de 56° C. La mezcla de reacción estaba compuesta por 25  $\mu$ l de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10  $\mu$ l de DNA ó bien 2.5  $\mu$ l de cDNA y los cebadores a una concentración final de 300 nM en un volumen final de 50  $\mu$ l. Esos 50  $\mu$ l se dividieron en dos tubos para realizar el análisis por duplicado. Los tamaños de los productos de amplificación obtenidos fueron los siguientes:

<b>HPRT</b>	91 Kb	<b>IL-4</b>	72 Kb
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	68 Kb	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	57 Kb

El análisis de las muestras fue realizado en placas de 96 pocillos especiales (96-well optical reaction plate with barcode, code 128, Applied Biosystems), que iban cubiertas con unas tapas especiales (Optical caps, Applied Biosystems).

## 28. DETERMINACION DE LA CARGA PARASITARIA EN BAZO E HIGADO DE CRICETO MEDIANTE UNA PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.

Aprovechando las ventajas que ofrece la PCR cuantitativa a tiempo real, decidimos poner a punto una técnica de cuantificación de parásitos en bazo e hígado de criceto. El fundamento de la técnica es el mismo que el explicado en el apartado anterior, pero en este caso solo eran necesarios cebadores que amplificaran secuencias de DNA específicas de *L. infantum*.

Así, el DNA genómico de *L. infantum* fue extraído a partir de 20 mg de bazo o hígado de animales infectados con 10<sup>7</sup> promastigotes de la cepa BCN150 de *L. infantum* y sacrificados el día 135 p.i., mediante un kit de extracción comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega).

Para poder realizar la cuantificación, también fue necesario realizar una curva patrón de DNA genómico de *L. infantum*. Para la extracción de dicho DNA genómico, a partir de 10<sup>7</sup> promastigotes en fase estacionaria de la cepa BCN150, se empleó un kit

comercial (G NOME<sup>®</sup> DNA KIT, BIO 101) y el DNA así extraído fue almacenado a –20° C hasta su uso.

Los cebadores empleados en este caso fueron diseñados mediante el software Primer Express a partir de una secuencia EcoRI/HaeIII de 196 bp para *L. infantum*, derivada de una región minicírculo del kinetoplasto que muestra variaciones interespecies (Gramiccia y cols., 1992) (Número de acceso en el GeneBank: S49390). Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

<b>Forward</b>	<b>5'-ACCCCAAATGAGGAACTAAGC-3'</b>
<b>Reverse</b>	<b>5'-TCAGTCGGCCGGAATTG-3'</b>

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95° C 10 minutos, 40 ciclos de 95° C 1 minuto, 56° C 1 minuto y 72° C 1 minuto, 72° C 7 minutos. Antes de proceder a la PCR cuantitativa se realizaron pruebas preliminares, al igual que en el caso anterior, visualizando los productos de amplificación en geles de agarosa al 3%.

Para la cuantificación, la mezcla de reacción estaba compuesta por 25 µl de SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10 µl de DNA y los cebadores a una concentración final de 300 nM en un volumen final de 50 µl. Esos 50 µl se dividieron en dos tubos para realizar el análisis por duplicado. El producto de amplificación obtenido tenía un tamaño de 81 Kb.

## **29. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE TRANSAMINASAS EN SUERO.**

En algunos experimentos se realizó la determinación de los niveles de transaminasas en suero. Para ello se empleó un kit comercial (Sigma) que servía para medir la Glutámico-Oxalacético-Transaminasa (GOT) y la Glutámico-Pirúvico-Transaminasa (GPT) mediante una reacción colorimétrica con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). La lectura se realizó en el espectrofotómetro a 490 nm.

## **30. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA.**

Los estudios de toxicidad *in vivo* fueron realizados en dos fases. En una primera etapa, se investigó la toxicidad aguda en animales sanos. Una vez conocida y

## **Material y métodos**

tomando como referencia los resultados obtenidos, se investigó la toxicidad aguda en los animales enfermos, ya que es posible que el desarrollo de la enfermedad potencie la toxicidad aguda del fármaco, lo que es necesario conocer antes de realizar los estudios de eficacia.

**30.1. Estudio de la toxicidad aguda en animales sanos:** se ensayó la toxicidad de las siguientes formulaciones:

- Anfotericina B de referencia en estado poliagregado formulada en microesferas de HSA.
- Anfotericina B de referencia en estado dimérico formulada en microesferas de HSA.
- Anfotericina B de referencia en estado monomérico formulada en microesferas de HSA.
- Fungizona®.
- Anfotericina B de referencia en estado dimérico.

En el estudio de cada preparación, se inyectaron las dosis de 2.5, 5, 10, 15, 20 y 40 mg/Kg de anfotericina B hasta igualar o superar la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>), a grupos de 7 cricetos cada uno.

**30.2. Estudio de la toxicidad aguda en animales enfermos:** los cricetos fueron infectados como ya se ha detallado anteriormente en el apartado 4 y el día 69 p.i. se administraron las mismas preparaciones que en animal sano a las dosis de 2.5, 5 y 40 mg/Kg de peso.

## **31. ANALISIS ESTADISTICO.**

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el **Test no paramétrico U-MannWhitney**, con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre los distintos lotes. Un valor  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

# ***Resultados***

## RESULTADOS.

### 1. ELECCION DEL MODELO EXPERIMENTAL Y DE LA DOSIS DE INFECCION.

Antes de ensayar las distintas formulaciones galénicas de anfotericina B, fue necesario establecer un modelo de infección por *L. infantum* en animales de laboratorio. Para ello decidimos realizar pruebas tanto en criceto dorado (*Mesocricetus auratus*) como en ratones Balb/c.

#### 1.1. Modelo experimental en criceto dorado.

Tal y como se ha señalado en la revisión bibliográfica, el criceto dorado es considerado un buen modelo de laboratorio para el estudio de la leishmaniosis canina y humana. Puesto que en el control de la leishmaniosis canina la respuesta inmune juega un papel decisivo, se ha llevado a cabo un seguimiento inmunológico. Así, hemos evaluado la influencia de la dosis infectante en el desarrollo de la infección (carga parasitaria en hígado y bazo); en la respuesta celular (linfoproliferación *in vitro* frente a mitógenos y antígenos y determinación de poblaciones linfocitarias a nivel local) y en la respuesta humoral (niveles de IgG y perfiles de reconocimiento antigénico).

Para ello, se dispusieron dos lotes de 8 cricetos machos cada uno. Ambos lotes fueron infectados por vía intracardiaca con promastigotes de “reciente aislamiento” (cuatro pases en cultivo en medio C-199 desde su transformación a partir de amastigotes) de la cepa **M/CAN/ES/96/BCN150** (BCN150). Las dosis de infección empleadas en cada lote fueron las siguientes:

**LOTE I:**  $10^5$  promastigotes/criceto.

**LOTE II:**  $10^7$  promastigotes/criceto.

También se incluyeron unos animales no infectados como controles sanos. La duración del experimento fue de 22 semanas (154 días). En el Lote I murieron el animal 2 y 8, pocos días después de realizarse la infección. En el Lote II murió el

## Resultados

animal 4, unas semanas antes del sacrificio. De los 5 animales que formaban el lote de los controles sanos también murió un animal tres semanas antes del sacrificio. Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 1:** Pesos de los cricetos en gramos a lo largo del experimento. La primera columna corresponde a los pesos determinados la semana antes de realizar la infección.

Lote	Animal	Semana p.i.								
		Preinf.	2 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>
I	1	62.3	77.7	96.3	108	119	126	125	130	127
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	61	77	92	99	108	107	110	110	107
	4	74	92.2	103	110	118	118	120	121	121
	5	74	92	100	105	115	119	122	123	121
	6	76	88.6	100	102	111	116	120	120	118
	7	63	80	91	97	106	107	109	110	112
	8	61	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Media</b>	<b>67.32</b>	<b>84.58</b>	<b>97.05</b>	<b>103.50</b>	<b>112.83</b>	<b>115.50</b>	<b>117.66</b>	<b>119</b>	<b>117.66</b>
	<b>DS</b>	<b>6.41</b>	<b>6.51</b>	<b>4.38</b>	<b>4.64</b>	<b>4.87</b>	<b>6.75</b>	<b>6.01</b>	<b>7.11</b>	<b>7.14</b>
II	1	69	80.5	93	119	103	107	106	80	68
	2	69	83.2	91.5	99	100	103	105	82	67
	3	67.6	76	84	87	86	90	93	90	86
	4	73.3	91	113	96	130	129	113	67	-
	5	70	79	92.5	96	101	102	106	94	84
	6	72.4	89.8	112	119	129	128	130	120	91
	7	63.4	75.6	86	90	92	96	96	70	64
	8	67	84	99.5	104	102	106	104	90	91
	<b>Media</b>	<b>68,75</b>	<b>82,50</b>	<b>97,60</b>	<b>101,25</b>	<b>105,37 *</b>	<b>107,62 *</b>	<b>106.62 *</b>	<b>86.62 *</b>	<b>78.71 *</b>
	<b>DS</b>	<b>1,26</b>	<b>6,56</b>	<b>14,01</b>	<b>12,12</b>	<b>15,96</b>	<b>14,01</b>	<b>11,31</b>	<b>16,55</b>	<b>11,91</b>
Control sano	1	68	81	93	102	116	118	118	-	130
	2	69	84	96	99	102	100	100	-	-
	3	70	81	92	94	96	106	108	-	114
	4	67	79	90	98	104	110	113	-	123
	5	69	80	92	93	95	100	100	-	104
	<b>Media</b>	<b>68.60</b>	<b>81</b>	<b>92.60</b>	<b>97.20</b>	<b>102.60</b>	<b>106.80</b>	<b>107.80</b>	<b>-</b>	<b>117.75</b>
<b>DS</b>	<b>1.14</b>	<b>1.87</b>	<b>2.19</b>	<b>3.70</b>	<b>8.41</b>	<b>7.56</b>	<b>7.95</b>	<b>-</b>	<b>11.27</b>	

A partir de la semana 10<sup>a</sup> p.i., el peso de todos los animales del lote infectado con la dosis mayor (10<sup>7</sup>), comienza a disminuir con respecto al lote infectado con la dosis menor y a partir de la semana 19<sup>a</sup> p.i., también es menor que en el grupo de los controles sanos (\* p< 0.05).

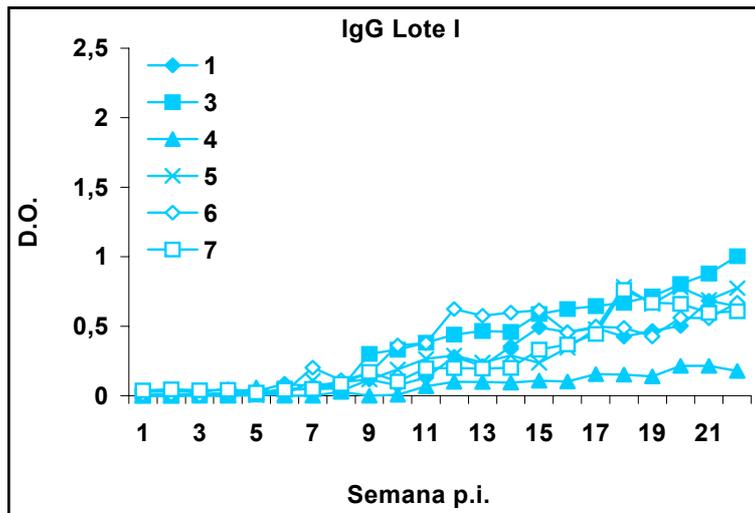
**Tabla 2:** Pesos de los órganos (bazo e hígado) en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, en el día del sacrificio (154 p.i.).

Lote	Animal	Pesos de los órganos		Amastigotes/mg órgano	
		Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
I	1	0.99	7.2	$1.57 \times 10^5$	$2.41 \times 10^3$
	3	0.7	6.78	$0.655 \times 10^5$	$1.38 \times 10^3$
	4	0.54	6.5	$0.218 \times 10^5$	$1.57 \times 10^3$
	5	0.66	7.65	$0.075 \times 10^5$	$0.076 \times 10^3$
	6	0.88	7.56	$0.165 \times 10^5$	$0.149 \times 10^3$
	7	0.61	5.63	$0.218 \times 10^5$	$0.414 \times 10^3$
	Media	<b>0.73 *</b>	<b>6.89</b>	<b><math>0,484 \times 10^5</math></b>	<b><math>1,000 \times 10^3</math></b>
DS	<b>0.17</b>	<b>0.76</b>	<b><math>0,569 \times 10^5</math></b>	<b><math>0,936 \times 10^3</math></b>	
II	1	0.7	4.7	$7.19 \times 10^6$	$1.56 \times 10^6$
	2	0.62	4.54	$4.57 \times 10^6$	$4.12 \times 10^6$
	3	0.81	5.85	$1.004 \times 10^6$	$0.101 \times 10^6$
	5	0.59	5.23	$1.39 \times 10^6$	$0.129 \times 10^6$
	6	0.82	5.99	$10.06 \times 10^6$	$0.367 \times 10^6$
	7	0.5	4.47	$0.694 \times 10^6$	$0.254 \times 10^6$
	8	0.69	6.44	$5.29 \times 10^6$	$0.179 \times 10^6$
Media	<b>0.67 *</b>	<b>5.42</b>	<b><math>4,314 \times 10^6 *</math></b>	<b><math>0,959 \times 10^6 *</math></b>	
DS	<b>0.12</b>	<b>0.79</b>	<b><math>3,534 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,485 \times 10^6</math></b>	
Control sano	1	0.11	6.38	-	-
	3	0.18	6.20	-	-
	4	0.12	6.73	-	-
	5	0.11	5.95	-	-
	Media	<b>0.13</b>	<b>6.31</b>	-	-
DS	<b>0.03</b>	<b>0.33</b>	-	-	

En los dos lotes infectados, existe un gran aumento del tamaño del bazo con respecto a los animales sanos (\*  $p < 0.05$ ), es decir, existe esplenomegalia. Sin embargo, no se aprecian grandes diferencias en cuanto al peso del hígado entre los tres grupos.

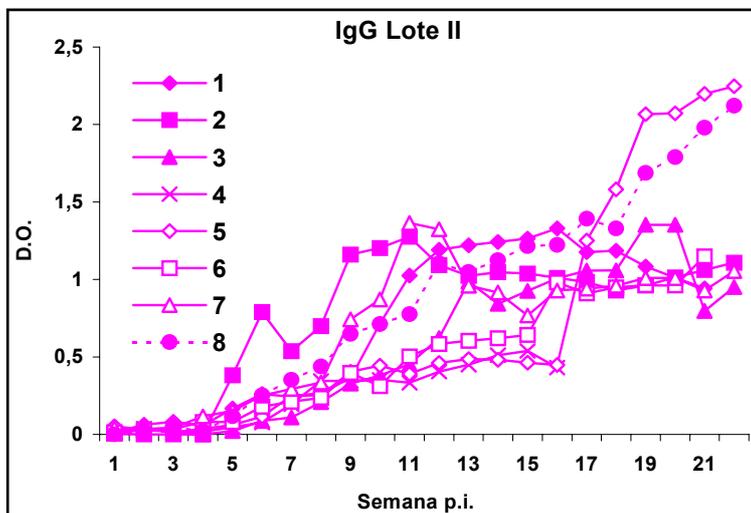
Los valores de la carga parasitaria en mg de órgano, presentan una gran variabilidad individual, pero los valores medios muestran que, tanto en el bazo como en el hígado, existe una mayor carga parasitaria en el lote infectado con  $10^7$  promastigotes que en el infectado con  $10^5$  promastigotes (\*  $p < 0.05$ ), tal y como era de esperar. En el Lote I encontramos cargas medias del orden de  $10^5$  y  $10^3$  en bazo e hígado respectivamente, mientras que en el Lote II encontramos cargas medias del orden de  $10^6$  en ambos órganos.

## Resultados



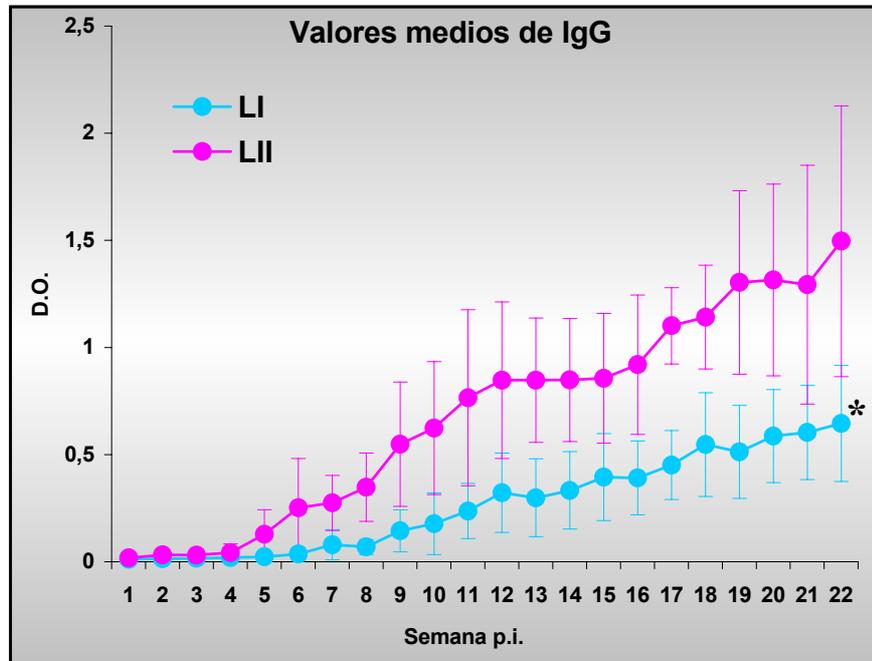
**Figura 1:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, en el Lote I:  $10^5$  promastigotes, determinados mediante ELISA indirecto. **D.O.:** D.O. problema-D.O. negativo.

En este lote de animales la respuesta por anticuerpos se empieza a detectar entre las semanas 7<sup>a</sup> y 9<sup>a</sup> p.i. y aunque existe variabilidad individual, por lo general los anticuerpos tienden a aumentar a lo largo del tiempo, con valores de D.O. de entre 0.17 y 1. Solamente el animal 4 presenta niveles muy bajos a lo largo del todo el experimento, mientras que el animal 3 llega a alcanzar valores de D.O. de 1 en la última semana.



**Figura 2:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, en el Lote II:  $10^7$  promastigotes, determinados mediante ELISA indirecto. **D.O.:** D.O. p-D.O. n.

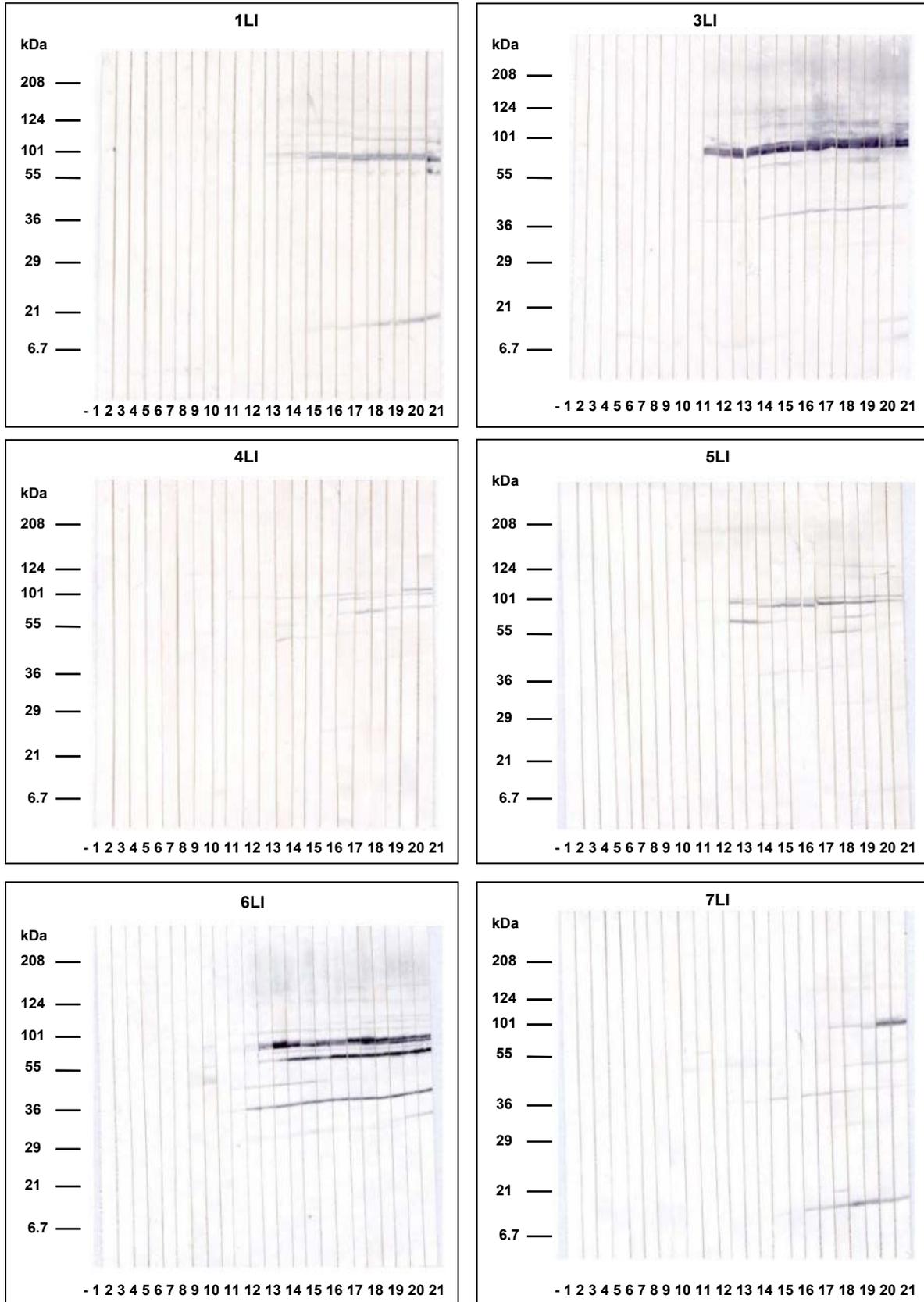
En este caso los animales empiezan a mostrar respuesta por IgG a partir de las semanas 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> p.i. Los niveles alcanzados son más altos que en el caso anterior, también con gran variabilidad individual, y valores de D.O. de entre 0.94 y 2.2 en las últimas semanas. Los animales 5 y 8 llegan a alcanzar valores de D.O. mayores de 2, mientras que los demás alcanzan valores de alrededor de 1.



**Figura 3:** Niveles medios de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, en ambos lotes, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n.

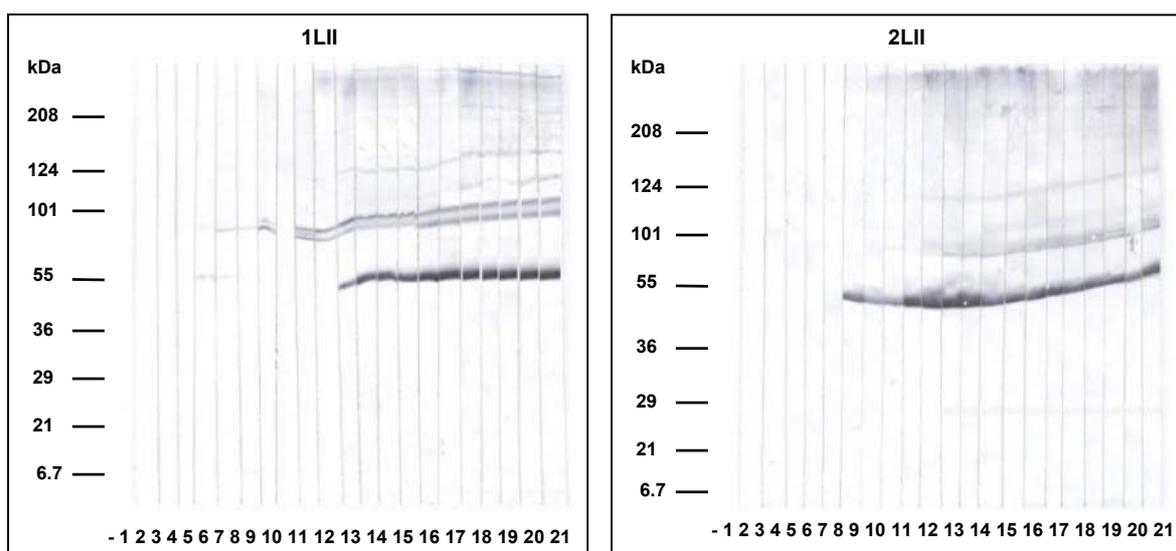
Esta gráfica resume muy bien las diferencias en la respuesta por IgG entre ambos lotes. Como era de esperar, el lote infectado con la dosis menor (Lote I) presenta menores niveles de anticuerpos que el infectado con la dosis mayor (\*  $p < 0,05$ ). Por lo tanto, existe correlación entre la carga parasitaria observada en bazo e hígado y los niveles de IgG producidos frente al antígeno de *L. infantum*.

**Resultados**



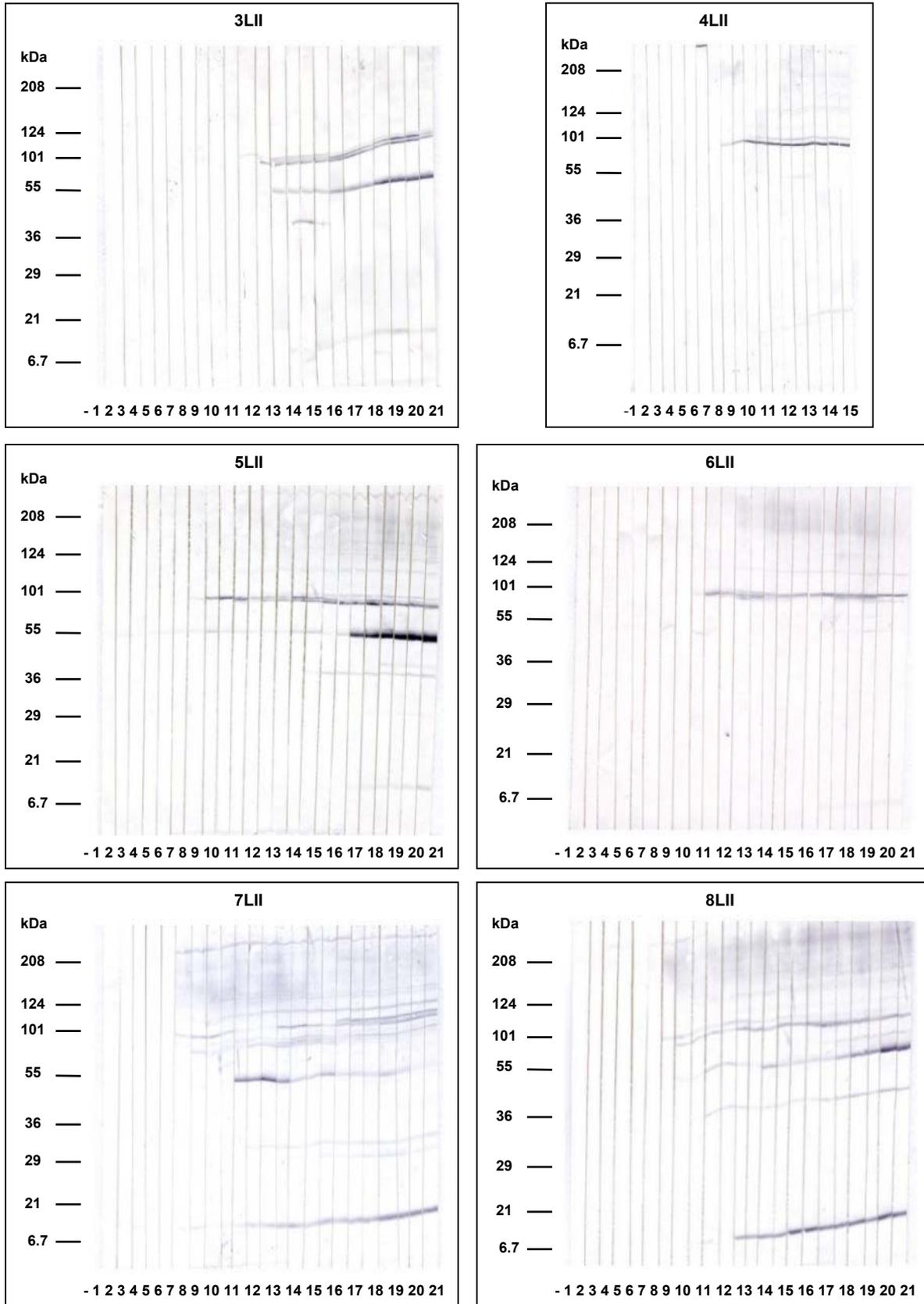
**Figura 4:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot, frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes a cada animal del Lote I:  $10^5$  promastigotes.

Los perfiles de reconocimiento antigénico en el Lote I muestran variabilidad individual, encontrando en general un patrón de bandas de entre 16 y 150 KDa, con aparición de la respuesta a partir de la semana 9<sup>a</sup> p.i. Tal y como habíamos visto en la respuesta por IgG determinada mediante ELISA, el animal 4 presentaba niveles muy bajos de anticuerpos, lo que concuerda con el perfil de reconocimiento antigénico, ya que casi no se observan bandas en ese animal. Sin embargo, aunque el animal 1 era el que presentaba una mayor respuesta por IgG, esto no se traduce en un mayor reconocimiento antigénico, siendo los animales 3 y 6 los que presentan un mayor reconocimiento e intensidad de bandas. En general, son más frecuentes las bandas de entre 40 y 150 KDa, apareciendo pocas bandas de bajo peso molecular de entre 16 y 18 KDa, solo en los animales 1, 3 y 7. En el animal 1 encontramos bandas de 16-18 KDa, 60, 80-90 KDa y las de 115, 125 y 150 KDa muy débiles, al final del experimento. En el animal 3 encontramos bandas de 16-18, 40, 60, 80-90, 115 y 125 KDa. En el animal 5 encontramos las bandas de 16-18 KDa, muy débil, la de 30 KDa y la de 40 KDa, muy débiles en las últimas semanas, la de 55 KDa al final del experimento, la de 60 KDa, que aparece y desaparece, las de 80-90 KDa y las de 115 y 125 KDa, muy débiles al final del experimento. En el animal 6 encontramos las bandas de 30, 40, 45, que desaparece, 60, 80-90, 115 y 125 KDa. Por último, en el animal 7 encontramos bandas de 16-18, 40, 50, 80-90, muy al final del experimento, y 125 KDa muy débil y al final del experimento.



**Figura 5:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot, frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes a los animales 1 y 2 del Lote II:  $10^7$  promastigotes.

**Resultados**



**Figura 6:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot, frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes a los animales 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del Lote II:  $10^7$  promastigotes.

En el Lote II el patrón de reconocimiento antigénico es más complejo que en el Lote I, con aparición de bandas de entre 16 y 150 KDa y comienzo de la respuesta a partir de la semana 6ª p.i. Los animales que presentan un mayor reconocimiento antigénico son los animales 1, 2, 5 y 8, siendo estos dos últimos los que presentaban una mayor respuesta por IgG mediante la técnica de ELISA. Las bandas más frecuentes son las de entre 30 y 150 KDa, siendo los animales 3, 5 y 8 los que presentan bandas de bajo peso molecular de 16-18 KDa. Encontramos también bandas de 40 y 55 KDa, la zona de 80-90 KDa y 115 KDa. En concreto, en el animal 1 aparecen las bandas de 55, 80-90, 115 y 125 KDa. En el animal 2 las de 30, 55, 80-90, 115 y 125 kDa. En el animal 3 las de 16-18, 55 y 80-90 KDa. En el animal 4 las de 16-18 y las de 80-90 KDa. En el animal 5 se observan las bandas de 16-18, 40, 42, 55 y 80-90 kDa. En el animal 6 aparecen la de 55 KDa, las de 80-90 KDa y la de 125 KDa. En el animal 7 encontramos bandas de 16-18, 30, 32, 55, 70, 80-90, 115, 125 y 150 KDa. Por último, en el animal 8 encontramos las de 16-18, 40, 55, 60, 80-90, 115 y 125 KDa.

## Resultados

**Tabla 3:** Porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD19 en el bazo de los animales pertenecientes a los lotes I y II, el día del sacrificio (154 p.i.). También se determinaron en el grupo de cricetos sanos y se incluyó un grupo de 4 ratones para comprobar el funcionamiento de los anticuerpos monoclonales.

Lote	Animal	Citometría de flujo	
		% CD4+	% CD19
I	1	6,14	2,05
	3	9,34	4,02
	4	8,34	3,07
	5	7,93	2
	6	6,18	1,71
	7	6,83	2,65
	<b>Media</b>	<b>7,46</b>	<b>2,58</b>
<b>DS</b>	<b>1,29</b>	<b>0,86</b>	
II	1	11,01	3,44
	2	15,82	7,12
	3	11,52	6,80
	5	11,83	6,57
	6	13,01	5,90
	7	12,84	6,61
	8	10,54	4,65
<b>Media</b>	<b>12,37 *</b>	<b>5,87</b>	
<b>DS</b>	<b>1,77</b>	<b>1,35</b>	
Control sano	1	7,44	4,33
	3	9,45	5,73
	4	9,40	4,66
	<b>Media</b>	<b>8,76</b>	<b>4,91</b>
<b>DS</b>	<b>1,15</b>	<b>0,73</b>	
Control ratón	1	16,32	21,03
	2	14,37	23,37
	3	17,66	28,87
	4	17,24	30,18
	<b>Media</b>	<b>16,40</b>	<b>25,86</b>
<b>DS</b>	<b>1,46</b>	<b>4,37</b>	

Como puede observarse, existe reacción cruzada entre criceto y ratón en cuanto a la población celular CD4+, dado que en ambos animales existe marcaje por parte del anticuerpo monoclonal, siendo este marcaje menor en criceto. Existe un aumento de células CD4+ en los animales infectados con la dosis mayor de *L. infantum*, tanto respecto al grupo de los animales sanos como respecto al lote infectado con la dosis menor (\*  $p < 0.05$ ). Los niveles de CD4+ en los animales infectados con la dosis baja son similares a los de los animales sanos.

En cuanto al porcentaje de células CD19, es mucho más bajo en los tres lotes respecto al grupo de ratones, por lo que pudiera ser que aquí no existiera tanta

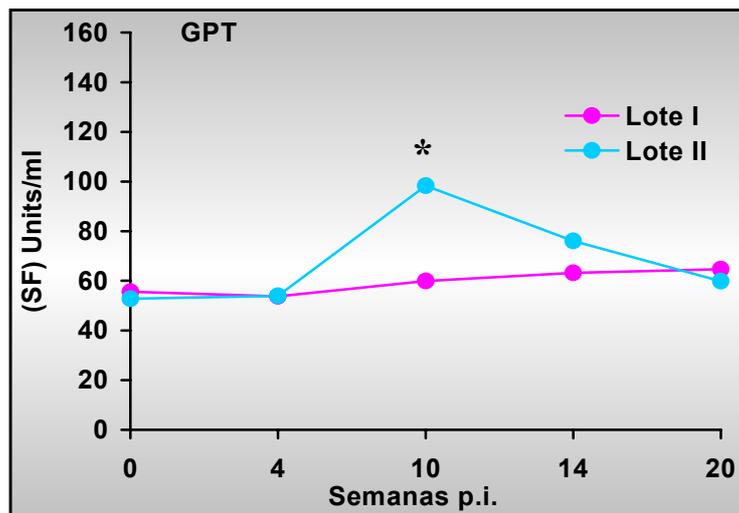
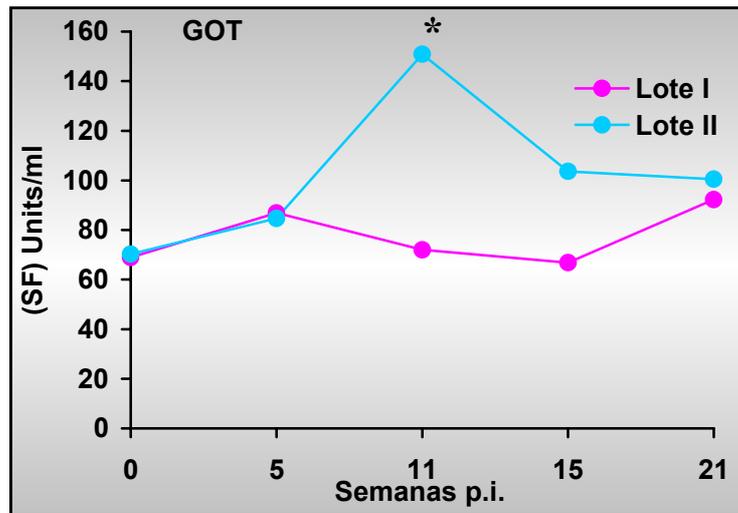
reacción cruzada. Por lo tanto, y tal y como se verá más adelante, en los demás experimentos realizados en criceto no se determinó esta subpoblación linfocitaria.

**Tabla 4:** Valores medios e individuales de los índices de estimulación correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro* con mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y antígenos (BCN150 y LEM75). Se consideró que había existido proliferación cuando  $IE \geq 2$ .

		Linfoproliferación <i>in vitro</i> , índices de estimulación (IE)			
		Mitógenos		Antígenos	
Lote	Animal	Con A	Fitoh.	BCN150	LEM75
I	1	22.19	2.66	1.27	0.63
	3	1.40	0.37	0.06	0.04
	4	12.46	3.32	0.08	0.50
	5	6.51	2.34	0.23	0.35
	6	4.45	0.41	0.77	0.25
	7	9.53	0.49	0.31	0.28
	Media	9.42 *	1.59	0.45	0.34
	DS	7.30	1.21	0.40	0.2
II	1	1.81	1.36	0.70	0.70
	2	0.78	1.05	0.54	0.28
	3	2.88	5.22	0.33	1.70
	5	7.60	1.08	0.25	0.29
	6	4.24	1.71	1.11	1.19
	7	1.18	0.49	0.08	0.49
	8	8.07	0.48	1.14	0.09
	Media	3.79 *	1.62	0.59	0.54
DS	2.90	1.52	0.50	0.5	
Control	1	32.08	3.05	0.41	0.34
	3	-	2.66	2.94	2.19
	4	28.84	3.64	0.39	0.28
	Media	30.46	3.11	1.25	1.03
	DS	1.62	0.40	1.40	1

En los dos lotes infectados con *L. infantum* existe una clara disminución de la proliferación celular frente a concanavalina A con respecto al grupo de los controles sanos (\*  $p < 0.05$ ), siendo ese descenso mayor en la mayoría de los animales del lote infectado con la dosis mayor ( $10^7$ ). Frente a fitohemaglutinina, solo existe proliferación en los animales sanos. Frente a los antígenos no existe proliferación en ningún caso. A nivel individual no se observa correlación entre la carga parasitaria recuperada en los órganos y el índice de estimulación.

Resultados



**Figuras 7 y 8:** Niveles de Glutámico-Oxalacético-Transaminasa (GOT) y de Glutámico-Pirúvico-Transaminasa (GPT) en suero, determinados mediante reacción colorimétrica con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) (Sigma). (SF) Units/ml: Sigma-Frankel Units/ml; 1 (SF) Units/ml: 0.48 U/L.

Se observa un aumento de ambas transaminasas en el lote infectado con la dosis mayor hasta la semana 10<sup>a</sup> p.i. (\*  $p < 0.05$ ), momento a partir del cual los valores disminuyen de nuevo hasta igualar los obtenidos con la dosis menor.

## **1.2. Modelo experimental en ratones Balb/c.**

El ratón es el animal más empleado como modelo de laboratorio debido a su fácil manejo y a la existencia de numerosos reactivos inmunológicos comerciales murinos, cosa que no ocurre en criceto. Por ello, el ratón sería el modelo ideal para poder realizar el seguimiento inmunológico de los distintos tratamientos farmacológicos frente a la leishmaniosis visceral. Sin embargo, tal y como se ha explicado en la revisión bibliográfica, este modelo es más adecuado para las leishmaniosis cutáneas porque en la leishmaniosis visceral los ratones son capaces de desarrollar una respuesta inmune eficaz y aunque existen parásitos acantonados en ciertos órganos, no se desarrollan síntomas clínicos.

Nos propusimos estudiar distintas dosis de infección en ratones Balb/c con el fin de comprobar si a dosis elevadas de una cepa virulenta (BCN150), se desarrollaban signos de la enfermedad y parámetros inmunológicos similares a los encontrados en perro.

Para ello, se dispusieron tres lotes de 6 ratones machos cada uno. Los lotes fueron infectados por vía intracardiaca con promastigotes de “reciente aislamiento” (cuatro pases en cultivo en medio C-199 desde su transformación a partir de amastigotes) de la cepa BCN150 de *L. infantum*. Las dosis de infección empleadas en cada lote fueron las siguientes:

**LOTE 1:**  $10^7$  promastigotes/ratón.

**LOTE 2:**  $10^6$  promastigotes/ratón.

**LOTE 3:**  $10^5$  promastigotes/ratón.

También se usaron algunos animales no infectados como controles sanos. La duración del experimento fue de 21 semanas (147 días). En el Lote 2 se murió el animal 5 y en el Lote 3 el animal 3, pocos días después de la infección.

Los resultados fueron los siguientes:

**Resultados**

**Tabla 5: Pesos de los animales en gramos a lo largo del experimento.**

		<b>Pesos de los animales a lo largo del experimento</b>						
		<b>Semana p.i.</b>						
<b>Lote</b>	<b>Animal</b>	<b>9<sup>a</sup></b>	<b>11<sup>a</sup></b>	<b>13<sup>a</sup></b>	<b>15<sup>a</sup></b>	<b>17<sup>a</sup></b>	<b>19<sup>a</sup></b>	<b>21<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	<b>1</b>	27.2	28.5	28.15	29.3	30.4	30	32.75
	<b>2</b>	25.6	27	27.3	27.6	28.3	29	29.67
	<b>3</b>	29.6	30	30	30.3	30.7	31.5	33.3
	<b>4</b>	23.5	24.1	24.1	25	26.2	26.8	27.8
	<b>5</b>	26	26.7	27.3	28.8	29	29.8	30.13
	<b>6</b>	27.2	28.1	28.2	30.2	29.4	29.9	29.37
	<b>Media</b>	<b>26.51</b>	<b>27.40</b>	<b>27.50</b>	<b>28.53</b>	<b>29</b>	<b>29.50</b>	<b>30.50</b>
	<b>DS</b>	<b>2.03</b>	<b>2</b>	<b>1.94</b>	<b>2</b>	<b>1.63</b>	<b>1.55</b>	<b>2.11</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	26	26.2	27	27.6	29.3	29.2	29.3
	<b>2</b>	25.2	26	27.4	28.7	30.2	30.4	30.15
	<b>3</b>	25.4	26.9	27.7	30.4	31	31.7	30.4
	<b>4</b>	25.3	26.6	28.2	28.2	29.7	30.8	29.42
	<b>5</b>	26	27.2	29.5	29.8	32.6	32.7	31.23
	<b>Media</b>	<b>25.58</b>	<b>26.58</b>	<b>27.96</b>	<b>28.94</b>	<b>30.56</b>	<b>30.96</b>	<b>30.10</b>
	<b>DS</b>	<b>0.39</b>	<b>0.49</b>	<b>0.97</b>	<b>1.15</b>	<b>1.30</b>	<b>1.32</b>	<b>0.79</b>
<b>3</b>	<b>1</b>	26.4	29	28.5	28.6	31.5	31.4	31.72
	<b>2</b>	23.6	24.9	24.8	25.6	26.3	25.9	25.5
	<b>3</b>	25.8	27.5	28.75	29.1	28.8	28.4	28.52
	<b>4</b>	26.3	28.8	28.9	28.5	30.1	29.5	29.06
	<b>6</b>	24.7	26.7	26.9	26.5	30.8	30.7	30.22
	<b>Media</b>	<b>25.36</b>	<b>27.38</b>	<b>27.57</b>	<b>27.66</b>	<b>29.50</b>	<b>29.18</b>	<b>29</b>
	<b>DS</b>	<b>1.19</b>	<b>1.68</b>	<b>1.74</b>	<b>1.52</b>	<b>2.05</b>	<b>2.16</b>	<b>2.31</b>
<b>Control sano</b>	<b>1</b>	26.6	28	32.4	33.8	34	32.5	28.4
	<b>2</b>	24.4	26.2	30.8	31.1	31.7	31.4	30.2
	<b>3</b>	25.4	26.4	31.4	33	32.8	31.9	31.0
	<b>4</b>	27	28	31.3	31.4	30.8	30.3	31.3
	<b>5</b>	25.7	26	33	32.2	32	32	32
	<b>Media</b>	<b>25.82</b>	<b>26.92</b>	<b>31.78</b>	<b>32.30</b>	<b>32.26</b>	<b>31.62</b>	<b>30.58</b>
	<b>DS</b>	<b>1.03</b>	<b>1</b>	<b>0.90</b>	<b>1.12</b>	<b>1.21</b>	<b>0.83</b>	<b>1.23</b>

No existen diferencias en cuanto al peso de los animales entre ninguno de los lotes infectados, es decir, el aumento de la dosis de infección no se traduce en una pérdida de peso y todos animales presentan el mismo aspecto, sin síntomas de enfermedad. Se observa un ligero descenso del peso en los tres lotes infectados, respecto a los controles sanos a partir de la semana 13<sup>a</sup> p.i., aunque se recupera en las últimas semanas, alcanzando valores similares a los de los controles sanos.

**Tabla 6:** Pesos de los órganos (bazo e hígado) en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, en el día del sacrificio (147 p.i.).

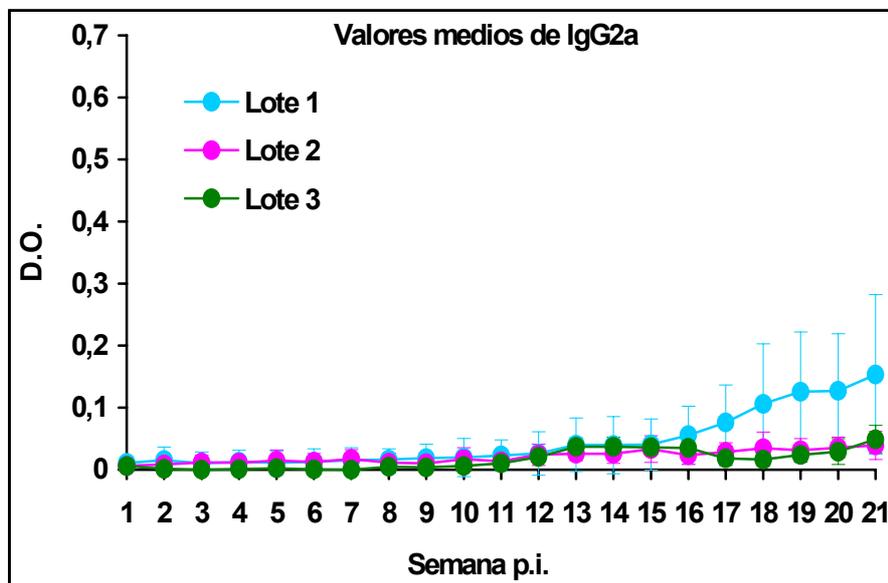
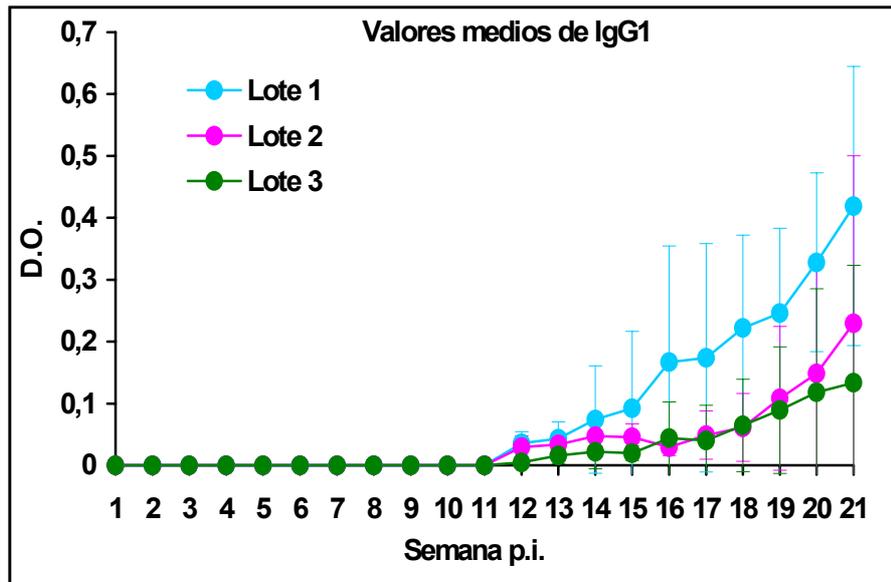
Animal/Lote	Pesos de los órganos		Amastigotes/mg órgano (x 10 <sup>3</sup> )	
	Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
1L1	0.75	1.79	12,48	0,0121
2L1	0.28	1.54	6,55	0
3L1	0.27	1.53	0,085	0
4L1	0.28	1.55	1,17	0
5L1	0.31	1.58	4,68	0
6L1	0.30	1.60	0,256	0
<b>Media</b>	<b>0.36 *</b>	<b>1.49</b>	<b>4,20</b>	<b>0</b>
<b>DS</b>	<b>0.19</b>	<b>0.16</b>	<b>4,39</b>	<b>0</b>
1L2	0.25	1.46	0	0
2L2	0.19	1.53	0,00137	0
3L2	0.19	1.51	0,0128	0
4L2	0.30	1.70	0,614	0
6L2	0.32	1.89	4,91	0
<b>Media</b>	<b>0.25 *</b>	<b>1.61</b>	<b>1,1 *</b>	<b>0</b>
<b>DS</b>	<b>0.06</b>	<b>0.18</b>	<b>1,91</b>	<b>0</b>
1L3	0.37	1.67	0	0
2L3	0.20	1.32	0,087	0
4L3	0.20	1.40	0,491	0
5L3	0.14	1.33	0,0006	0
6L3	0.34	1.83	0	0
<b>Media</b>	<b>0.25 *</b>	<b>1.51</b>	<b>0,115 *</b>	<b>0</b>
<b>DS</b>	<b>0.10</b>	<b>0.23</b>	<b>0,19</b>	<b>0</b>
CS1	0.11	1.12	-	-
CS2	0.10	1.20	-	-
CS3	0.09	1.29	-	-
<b>Media</b>	<b>0.10</b>	<b>1.20</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>DS</b>	<b>0.008</b>	<b>0.06</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Existe un aumento del tamaño del bazo en todos los animales infectados respecto a los animales del grupo sano (\*  $p < 0.05$ ). Los pesos de los hígados en todos los animales infectados, son algo mayores que en los animales sanos.

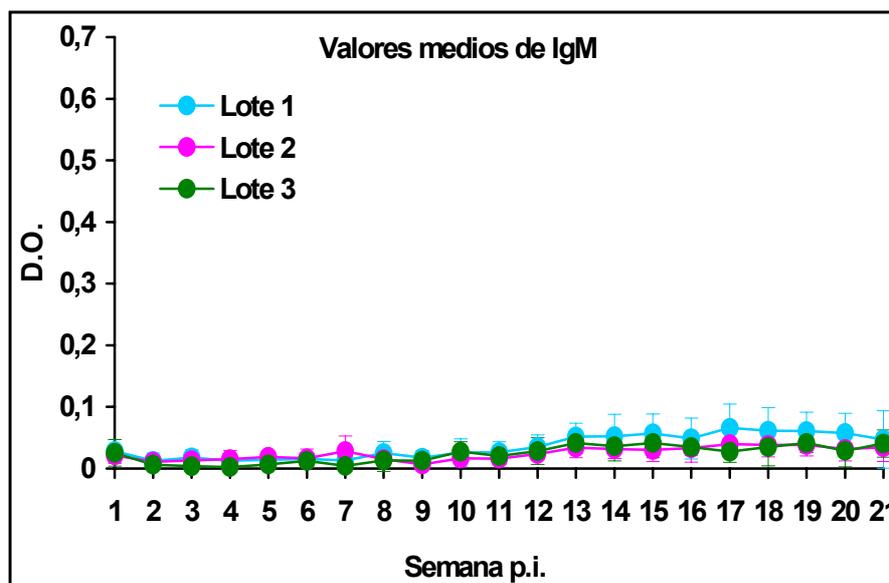
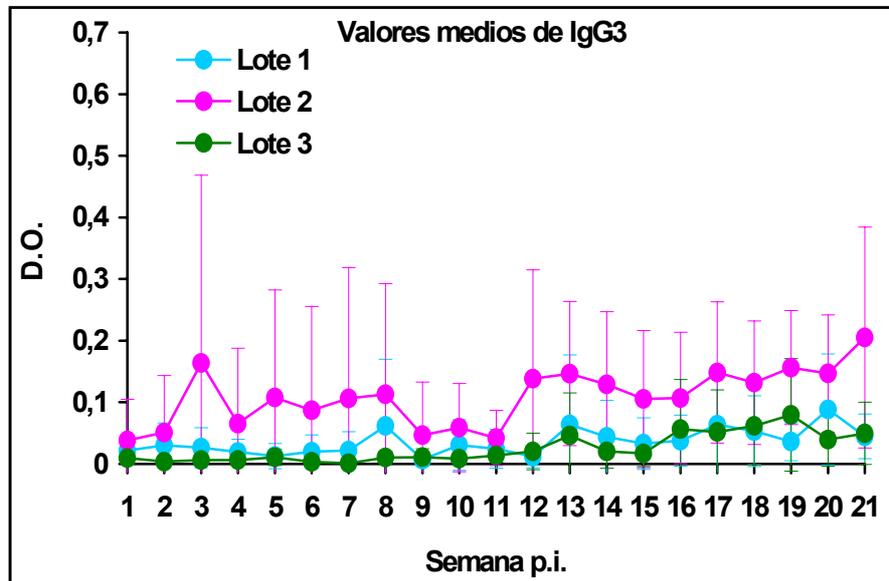
En cuanto a la carga parasitaria, no existen amastigotes en hígado, excepto en un animal del lote 1, y en el bazo, a pesar de la variabilidad existente, en términos generales, a medida que disminuye la dosis de infección, se recuperan menos parásitos (\*  $p < 0.05$ ).

## Resultados

Solo se muestran los valores medios de los niveles de anticuerpos, puesto que éstos son muy bajos en casi todos los casos y aparecen muy tardíamente. Solamente para la IgG1 los niveles son más altos, existiendo una correlación directa entre la dosis de infección y la respuesta por esta inmunoglobulina.

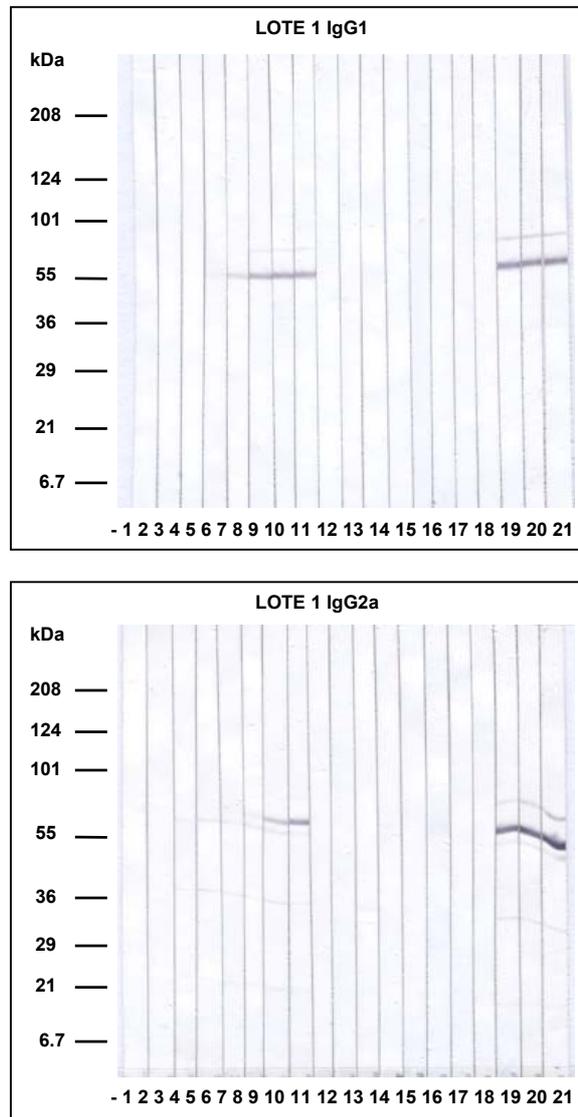


**Figuras 9 y 10:** Valores medios de anticuerpos (IgG1 e IgG2a), frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes a cada lote y determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n.



**Figuras 11 y 12:** Valores medios de anticuerpos (IgG3 e IgM), frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes a cada lote y determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n.

## Resultados



**Figura 13:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot, frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes al lote 1 (en este caso se realizó un pool de sueros), para las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a.

Al igual que en el caso de los anticuerpos, prácticamente no existe reconocimiento antigénico frente a ninguna inmunoglobulina. Solamente en el lote 1 se aprecia cierta respuesta frente a IgG1 e IgG2a en las últimas semanas, con bandas por encima de los 55 KDa. En los demás lotes no existió reconocimiento frente a ninguna inmunoglobulina.

**Tabla 7:** Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en bazo, determinadas mediante citometría de flujo, en el día del sacrificio (147 p.i.).

Animal	Subpoblaciones linfocitaria						
	CD4+	CD8+	CD19	TCR $\beta$ ( $\alpha\beta$ )	TCR $\gamma\delta$	CD45	CD4+/CD8+
1L1	21.42	10.54	47.62	66.26	0.28	77.79	2.03
2L1	28.40	13.34	34.84	79.37	0.35	82	2.12
3L1	28.01	10.22	29.95	70.09	0.24	74.27	2.74
4L1	29.55	11.60	30.20	73.86	0.62	81.41	2.54
5L1	23.42	10.59	33.13	66.98	0.29	66.98	2.21
6L1	17.46	10.89	44.35	81.96	0.15	78.29	1.6
<b>Media</b>	<b>24.71</b>	<b>11.19</b>	<b>36.68</b>	<b>73.08 *</b>	<b>0.321 *</b>	<b>76.79 *</b>	<b>2.2</b>
<b>DS</b>	<b>4.33</b>	<b>1.05</b>	<b>6.85</b>	<b>5.93</b>	<b>0.14</b>	<b>5.07</b>	<b>0.36</b>
1L2	14.59	6.75	30.20	69.56	0.23	56.69	2.16
2L2	19.59	8.52	34.71	54	0.63	83.32	2.29
3L2	17.87	8.46	47.11	71.48	0.50	73.26	2.11
4L2	18.81	9.40	36.97	49.79	0.44	73.72	2
6L2	20.28	11.29	34.46	43.68	0.59	71.75	1.79
<b>Media</b>	<b>18.22 *</b>	<b>8.88</b>	<b>36.69</b>	<b>57.70</b>	<b>0.47</b>	<b>71.74 *</b>	<b>2.07</b>
<b>DS</b>	<b>1.98</b>	<b>1.47</b>	<b>5.65</b>	<b>10.98</b>	<b>0.14</b>	<b>8.56</b>	<b>0.17</b>
1L3	17.04	7.32	39.27	51.18	0.72	67.96	2.32
2L3	21.90	7.81	34.66	57.97	0.24	66.42	2.80
4L3	27.30	11.02	37.48	65.72	0.42	82.27	2.47
5L3	25.60	9.25	42.91	58.08	0.81	83.28	2.76
6L3	13.48	6.96	37.82	40.08	0.46	62.16	1.93
<b>Media</b>	<b>21.06 *</b>	<b>8.47</b>	<b>38.42</b>	<b>54.60</b>	<b>0.53</b>	<b>72.41 *</b>	<b>2.45</b>
<b>DS</b>	<b>5.17</b>	<b>1.49</b>	<b>2.69</b>	<b>8.59</b>	<b>0.20</b>	<b>8.67</b>	<b>0.32</b>
CS1	28.33	10.94	41.42	52.41	0.54	89.90	2.58
CS2	29.10	11.02	42.30	50.30	0.61	89.20	2.16
CS3	27.20	10.50	40.09	51.40	0.51	87.30	2.62
<b>Media</b>	<b>28.21</b>	<b>10.82</b>	<b>41.27</b>	<b>51.37</b>	<b>0.55</b>	<b>88.80</b>	<b>2.45</b>
<b>DS</b>	<b>0.78</b>	<b>0.22</b>	<b>0.90</b>	<b>0.86</b>	<b>0.04</b>	<b>1.09</b>	<b>0.20</b>

En cuanto a la subpoblación CD4+, existe diferencia entre los distintos lotes, existiendo más porcentaje de células CD4+ en el lote sano, a continuación en el lote 1 (dosis de  $10^7$ ), seguido del lote 3 (dosis de  $10^5$ ) (\*  $p < 0.05$ ) y por último el lote 2 (dosis de  $10^6$ ) (\*  $p < 0.05$ ). No se observan diferencias significativas, con respecto al grupo sano, en la población CD8+, ni en los linfocitos B (CD19) en ninguno de los grupos. La subpoblación TCR $\beta$  aumenta en relación directa con la dosis de infección y la subpoblación TCR $\gamma\delta$  disminuye al aumentar la dosis de infección. La subpoblación CD45 disminuye ligeramente en todos los lotes infectados respecto al grupo sano (\*  $p < 0.05$ ). La relación CD4+/CD8+ es similar en todos los lotes.

## Resultados

**Tabla 8:** Valores medios e individuales de los índices de estimulación de los distintos lotes, correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro* con mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y antígeno de la cepa LEM75.

		Linfoproliferación <i>in vitro</i> , índices de estimulación (IE)					
		Mitógenos		Antígenos			
Lote	Animal	Con A	Fitoh.	LEM75	LEM75+Con A	LEM75+Fit.	
1	1	85.87	26.84	0.68	3.64	5.19	
	2	94.38	48.95	0.68	13.48	17.02	
	3	30.60	15.07	1.95	4.40	9.78	
	4	81.26	49.31	0.65	18.04	17.95	
	5	98.59	44.47	0.75	40.50	35.71	
	6	19.32	19.2	0.71	5.89	9.57	
		<b>Media</b>	<b>68.34 *</b>	<b>33.97 *</b>	<b>0.91</b>	<b>14.33 *</b>	<b>15.87 *</b>
	<b>DS</b>	<b>34.34</b>	<b>15.47</b>	<b>0.51</b>	<b>14.02</b>	<b>10.86</b>	
2	1	11.92	19.67	2.22	8.02	16.05	
	2	35.29	28.72	0.63	18.70	11.36	
	3	26.81	32.33	0.84	15.62	22.07	
	4	153.19	123.07	0.84	43.02	56.82	
	6	158.10	137.32	1.81	58.59	76.04	
		<b>Media</b>	<b>77.06 *</b>	<b>68.22 *</b>	<b>1.27</b>	<b>28.79 *</b>	<b>36.47 *</b>
		<b>DS</b>	<b>72.24</b>	<b>56.98</b>	<b>0.70</b>	<b>21.2</b>	<b>28.44</b>
3	1	271.06	162.60	0.58	35.28	90.87	
	2	268.40	199.98	0.91	58.36	71.47	
	4	241.51	213.51	0.85	68.41	88.44	
	5	110.55	239.51	2.66	83.37	86.67	
	6	155.68	117.07	0.69	39.03	64.41	
		<b>Media</b>	<b>209.44</b>	<b>186.46 *</b>	<b>1.14</b>	<b>56.89</b>	<b>80.37 *</b>
		<b>DS</b>	<b>72.41</b>	<b>47.68</b>	<b>0.86</b>	<b>20.14</b>	<b>11.72</b>
Control sano	1	86.70	255.99	1.44	33.85	114.42	
	2	323.15	250.8	1.37	32.61	112.90	
	3	248.07	262.94	1.52	35.87	116.81	
		<b>Media</b>	<b>219.30</b>	<b>256.57</b>	<b>1.44</b>	<b>34.11</b>	<b>114.71</b>
		<b>DS</b>	<b>98.64</b>	<b>4.97</b>	<b>0.06</b>	<b>1.34</b>	<b>1.60</b>

A medida que aumenta la dosis de infección se observa un mayor descenso de la proliferación celular frente a los mitógenos con respecto al grupo de los animales sanos (\*  $p < 0.05$ ). Frente al antígeno solo, no existe proliferación en ningún caso, es decir, existe una inhibición de la proliferación específica. Además, parece que el antígeno también inhibe la proliferación inespecífica, ya que al asociarlo con los mitógenos la respuesta disminuye significativamente con respecto al control de infección (\*  $p < 0.05$ ), y dicha inhibición es mayor al aumentar la dosis de infección.

Consideramos que el ratón no es un buen modelo para estudiar la eficacia de fármacos frente a la leishmaniosis visceral debido a la inexistencia de parasitación en el hígado, así como a la ausencia de manifestaciones clínicas. La

respuesta por anticuerpos es muy baja o nula, con prácticamente ausencia de reconocimiento antigénico.

En consecuencia, decidimos aplicar el modelo en criceto a pesar de su mayor dificultad de manejo y a la escasez de reactivos inmunológicos comerciales.

## **2. TRATAMIENTO EN LA FASE TEMPRANA (ASINTOMÁTICA) DE LA INFECCIÓN, CON ANFOTERICINA B LIBRE Y FORMULADA EN MICROESFERAS DE HSA, A LA DOSIS DE 1 mg/Kg/día.**

Se empezó utilizando esta dosis porque es la que se emplea habitualmente en terapéutica para la Fungizona<sup>®</sup>. El objetivo de este estudio preliminar era comparar la eficacia de la anfotericina B en estado libre o microencapsulada en un polímero de **Albúmina Sérica Humana (Human Seric Albumin: HSA)**. La anfotericina B empleada como materia prima fue elaborada en el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica de esta Facultad y es considerada un símil de la anfotericina B comercial (Fungizona<sup>®</sup>), por lo que la hemos denominado “anfotericina B de referencia”. En este caso se empleó en estado de agregación **dimérico** porque es el estado que presenta la anfotericina B en la especialidad farmacéutica comercial. Como se verá más adelante, en otros experimentos se han empleado otros estados de agregación. En este caso se dispusieron tres lotes homogéneos de 10 cricetos machos cada uno:

**Lote 1:** Control de infección.

**Lote 2:** Anfotericina B de referencia en estado **dimérico**.

**Lote 3:** Anfotericina B de referencia en estado **dimérico**, formulada en microesferas de HSA.

Todos los cricetos fueron infectados por vía intracardiaca con  $10^7$  promastigotes de “reciente aislamiento” de la cepa BCN150 de *L. infantum*. El tratamiento farmacológico se realizó los días **25, 27 y 29 p.i.** (dosis de **1 mg/Kg peso/día**). El sacrificio de los animales se realizó en dos tiempos: 5 animales de cada lote el día 32 p.i. (**Lotes 1A, 2A, 3A**) y los 5 animales restantes el día 135 p.i. (**Lotes 1B, 2B, 3B**). Los animales fueron pesados en el momento del sacrificio.

## 2.1. Resultados a día 32 p.i.:

**Tabla 9:** Pesos de los animales y de los órganos, en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, tanto en bazo como en hígado, en el día 32 p.i.

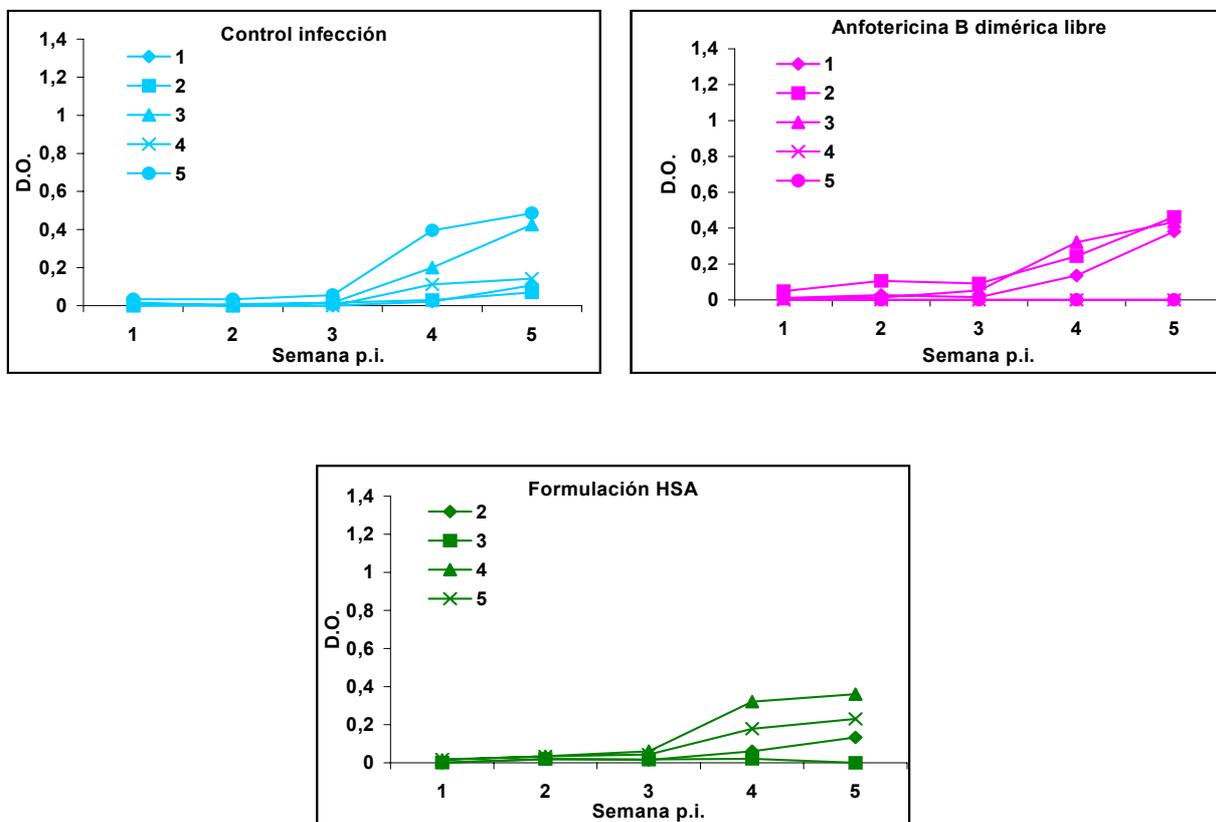
Lote	Animal	Pesos			Amastigotes/mg órgano	
		Criceto	Bazo	Hígado	Bazo (x 10 <sup>6</sup> )	Hígado (x 10 <sup>7</sup> )
1A	1	96,56	0,21	5,73	2.549	64.570
	2	103,17	0,23	5,95	2.272	60.920
	3	95,80	0,26	5,61	6.458	115.340
	4	89,55	0,12	5,05	2.024	52.500
	5	94,99	0,32	4,78	4.800	187.450
	Media	<b>96,01</b>	<b>0,23</b>	<b>5,42</b>	<b>3.620</b>	<b>96.156</b>
	DS	<b>4,34</b>	<b>0,06</b>	<b>0,43</b>	<b>1.933</b>	<b>56.673</b>
2A	1	94,61	0,34	5,27	6.506	71.230
	2	88,90	0,18	4,68	2.885	51.050
	3	82,90	0,26	5,05	3.242	56.530
	4	88,45	0,14	5,13	1.175	26.150
	5	82,56	0,15	4,77	2.380	17.860
	Media	<b>87,48</b>	<b>0,21</b>	<b>4,98</b>	<b>3.237</b>	<b>44.564 *</b>
	DS	<b>4,44</b>	<b>0,07</b>	<b>0,22</b>	<b>1.987</b>	<b>22.070</b>
3A	2	89,48	0,22	5,89	0.400	5.540
	3	83,58	0,16	5,39	0.232	11.550
	4	93,84	0,22	5,75	0.606	13.390
	5	98,27	0,25	6	0.600	12.480
	Media	<b>91,29</b>	<b>0,21</b>	<b>5,75</b>	<b>0.459 *</b>	<b>10.740 *</b>
	DS	<b>5,43</b>	<b>0,03</b>	<b>0,22</b>	<b>0.179</b>	<b>3.547</b>

En este momento de sacrificio (día 3 post-tratamiento) no se observan diferencias en los pesos de los animales entre los tres lotes. Tampoco existen diferencias entre lotes respecto al peso de los órganos. En el bazo, la nueva formulación consigue reducir considerablemente el número de parásitos con respecto al lote control de infección (\*  $p < 0.05$ ), mientras que en el lote tratado con la anfotericina B de referencia la reducción es muchísimo menor. En el hígado, tanto la anfotericina B libre como encapsulada reducen el número de parásitos en comparación con el control de infección (\*  $p < 0.05$ ), pero esta reducción es mucho mayor con la formulación de albúmina.

**Tabla 10:** Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de cada lote respecto al control de infección.

% REDUCCION DE LA CARGA PARASITARIA RESPECTO AL CONTROL INFECCION		
	Bazo	Hígado
Anfo B dimérica libre	11.11	53.65 *
Formulación	87.25 *	88.82 *

\*  $p < 0.05$



**Figura 14:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75 determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. Lote 1A: control de infección; Lote 2A: anfotericina B libre; Lote 3A: formulación de HSA.

## **Resultados**

En este momento de evolución de la infección, los niveles de anticuerpos aún son muy bajos. La respuesta por IgG comienza a partir de la semana 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> p.i. para algunos animales. En el lote tratado con la nueva formulación, aunque parece que los niveles de anticuerpos tienden a ser más bajos en el lote tratado con la nueva formulación, aún es pronto para sacar conclusiones porque hay que recordar que el tratamiento se realizó en la semana 4<sup>a</sup> p.i. Esta claro que es necesario realizar una dinámica por anticuerpos durante más tiempo para poder ver el efecto del tratamiento.

No se han realizado pruebas de western-blot en este caso porque considerábamos que no iban a aportar gran información debido a que los niveles de anticuerpos son aún muy bajos y el reconocimiento antigénico es débil o inexistente en estas primeras semanas p.i., tal y como vimos en las pruebas de la puesta a punto del modelo de infección en criceto.

**Tabla 11:** Porcentaje de la subpoblación linfocitaria CD4+ en bazo, en el día 32 p.i.

Lote	Citometría	
	Animal	% CD4+
1A	1	19,04
	2	18,60
	3	28,48
	4	31,47
	5	35,68
	<b>Media</b>	<b>26,65 *</b>
	<b>DS</b>	<b>7,59</b>
2A	1	25,11
	2	38,47
	3	26,33
	4	28,64
	5	21,82
	<b>Media</b>	<b>28,07 *</b>
	<b>DS</b>	<b>6,31</b>
3A	2	32,57
	3	27,66
	4	39,22
	5	23,03
	<b>Media</b>	<b>30,62 *</b>
	<b>DS</b>	<b>6,93</b>
Control sano	1	22,66
	2	23,40
	3	20,70
	<b>Media</b>	<b>22,25</b>
	<b>DS</b>	<b>1,13</b>

En este día de sacrificio no existen grandes variaciones en esta subpoblación entre los tres grupos infectados, pero el porcentaje de células CD4+ es mayor que en el grupo de los animales sanos (\*  $p < 0.05$ ). En el lote control de infección los animales 4 y 5 son los que mayor porcentaje de células CD4+ presentan, siendo el animal 5 uno de los que presenta mayor carga parasitaria en bazo y en el que mayor nivel de anticuerpos se observa, pero el animal 4 tiene un porcentaje de células CD4+ similar y sin embargo, presenta menor carga y anticuerpos que el anterior. En el lote tratado con la anfotericina dimérica libre no existe correlación con la carga parasitaria, pero el animal con más células CD4+ es uno de los que presenta mayores niveles de anticuerpos. En el lote tratado con la formulación de albúmina, los animales con mayor porcentaje de células CD4+ (el 2 y el 4) sí son los de mayor carga parasitaria, siendo el animal 4 el que presenta niveles de anticuerpos más altos, pero sin embargo, el animal 5 con carga similar a la del animal 4, tiene menor porcentaje de células CD4+ que él.

## Resultados

**Tabla 12:** Índices de estimulación correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro*, frente a mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y antígenos (LEM75 y BCN150) el día 32 p.i. Se consideró que había existido proliferación cuando  $IE \geq 2$ .

Lote	Animal	Índices de estimulación (IE) a día 32 p.i.			
		Mitógenos		Antígenos	
		Con A	Fitoh.	LEM75	BCN150
1A	1	1.19	1.04	1.30	0.76
	2	1.00	0.50	1.07	0.38
	3	2.16	2.56	1.20	0.89
	4	1.75	0.71	0.84	1.53
	5	0.54	0.59	1.11	1.47
	<b>Media</b>	<b>1.32</b>	<b>1.08</b>	<b>1.10</b>	<b>1.00</b>
	<b>DS</b>	<b>0.56</b>	<b>0.76</b>	<b>0.15</b>	<b>0.43</b>
2A	1	1.47	1.40	0.76	0.67
	2	0.51	0.45	0.56	0.56
	3	0.45	0.46	0.94	0.60
	4	0.81	1.73	1.16	0.73
	5	0.90	0.61	1.20	0.77
	<b>Media</b>	<b>0.81</b>	<b>0.93</b>	<b>0.92</b>	<b>0.66</b>
	<b>DS</b>	<b>0.33</b>	<b>0.53</b>	<b>0.24</b>	<b>0.078</b>
3A	1	-	-	-	-
	2	0.41	0.39	0.77	0.54
	3	1.31	1.27	0.40	0.80
	4	1.36	0.56	0.76	1.15
	5	2.17	0.93	0.96	0.61
	<b>Media</b>	<b>1.31</b>	<b>0.78</b>	<b>0.72</b>	<b>0.77</b>
	<b>DS</b>	<b>0.62</b>	<b>0.34</b>	<b>0.20</b>	<b>0.23</b>
Control sano	1	15.81	2.64	0.75	0.45
	2	20.35	4.21	0.52	0.31
	3	18.12	2.96	0.41	0.36
	<b>Media</b>	<b>18.09</b>	<b>3.27</b>	<b>0.56</b>	<b>0.37</b>
	<b>DS</b>	<b>1.85</b>	<b>0.67</b>	<b>0.14</b>	<b>0.06</b>

No existe proliferación frente a los mitógenos, ni frente a los antígenos. Es decir, se ha producido una inhibición de la proliferación celular antígeno-específica e inespecífica (frente a mitógenos). Por lo tanto, a pesar de la mayor eficacia de la formulación de albúmina en ese punto (día 3 p.t.), aún no se ha conseguido recuperar la proliferación celular. Hay que recordar que en este punto tampoco se habían producido variaciones en la subpoblación celular CD4+ entre los tres lotes infectados.

## 2.2. Resultados a día 135 p.i.:

**Tabla 13:** Pesos de los animales y de los órganos en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, tanto en bazo como en hígado, en el día 135 p.i.

Lote	Animal	Pesos			Amastigotes/mg órgano	
		Criceto	Bazo	Hígado	Bazo (x 10 <sup>6</sup> )	Hígado (x 10 <sup>7</sup> )
1B	1	129.75	0.87	8.26	57.600	377.040
	3	85	0.50	6	54.223	321.540
	4	99.90	0.69	6.66	83.349	745.810
	5	88.30	0.65	6.57	105.922	539.260
	<b>Media</b>	<b>100.73</b>	<b>0.67</b>	<b>6.87</b>	<b>75.273</b>	<b>495.912</b>
	<b>DS</b>	<b>17.64</b>	<b>0.13</b>	<b>0.84</b>	<b>24.221</b>	<b>190.494</b>
2B	1	-	0.34	2.46	35.360	335.570
	2	-	0.41	3.61	55.700	474.620
	4	91.92	0.85	5.89	75.510	239.310
	5	-	0.40	3.96	40.150	594
	<b>Media</b>	<b>-</b>	<b>0.50</b>	<b>3.98</b>	<b>51.680 *</b>	<b>410.875</b>
	<b>DS</b>	<b>-</b>	<b>0.20</b>	<b>1.23</b>	<b>18.104</b>	<b>155.674</b>
3B	1	97	0.64	6.70	31.890	165.280
	2	113.6	1.20	8.10	38.840	93.480
	3	64.50	0.40	4.44	30.250	71.310
	4	83.90	0.59	6.26	45.750	290.460
	5	71	0.54	5.45	26.460	204.640
	<b>Media</b>	<b>86</b>	<b>0.67</b>	<b>6.19</b>	<b>34.638 *</b>	<b>165.034 *</b>
<b>DS</b>	<b>17.74</b>	<b>0.27</b>	<b>1.22</b>	<b>7.661</b>	<b>88.324</b>	

Al observar la tabla resulta paradójico encontrar que en el lote tratado con la anfotericina B libre se muestren los pesos del bazo y el hígado de los todos los animales y sin embargo, solo se muestre el peso corporal de un animal. La explicación es la siguiente: los animales 1, 2 y 5 murieron antes del día del sacrificio y al hallarlos muertos consideramos que el peso del animal no iba a ser real; además algunos de ellos no estaban íntegros. Pero si pudimos recuperar los bazos y los hígados enteros pudiéndose pesar y determinar la carga parasitaria, aunque no tuvimos la oportunidad, en esos días, de realizar la determinación de la subpoblación CD4+ o la linfoproliferación *in vitro*. La muerte prematura de estos animales da un indicio de que la anfotericina B libre, en estado dimérico, puede ser más tóxica que la encapsulada, ya que no murió ningún animal del lote control antes de lo previsto y pensamos que las muertes en el lote 2B se deben a la toxicidad del principio activo, que contribuiría a exacerbar los signos de enfermedad y como consecuencia la muerte. En este sentido, hay que destacar que en el lote tratado con la formulación de albúmina, a pesar de

## Resultados

existir esplenomegalia, el aspecto macroscópico de los órganos era mejor y existía menos necrosis.

Al contrario de lo esperado, el peso de los animales tratados con la formulación de HSA es menor que el de los animales controles de infección. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el lote control de infección existe un animal, el número 1 que, al pesar más, desvirtúa los valores medios.

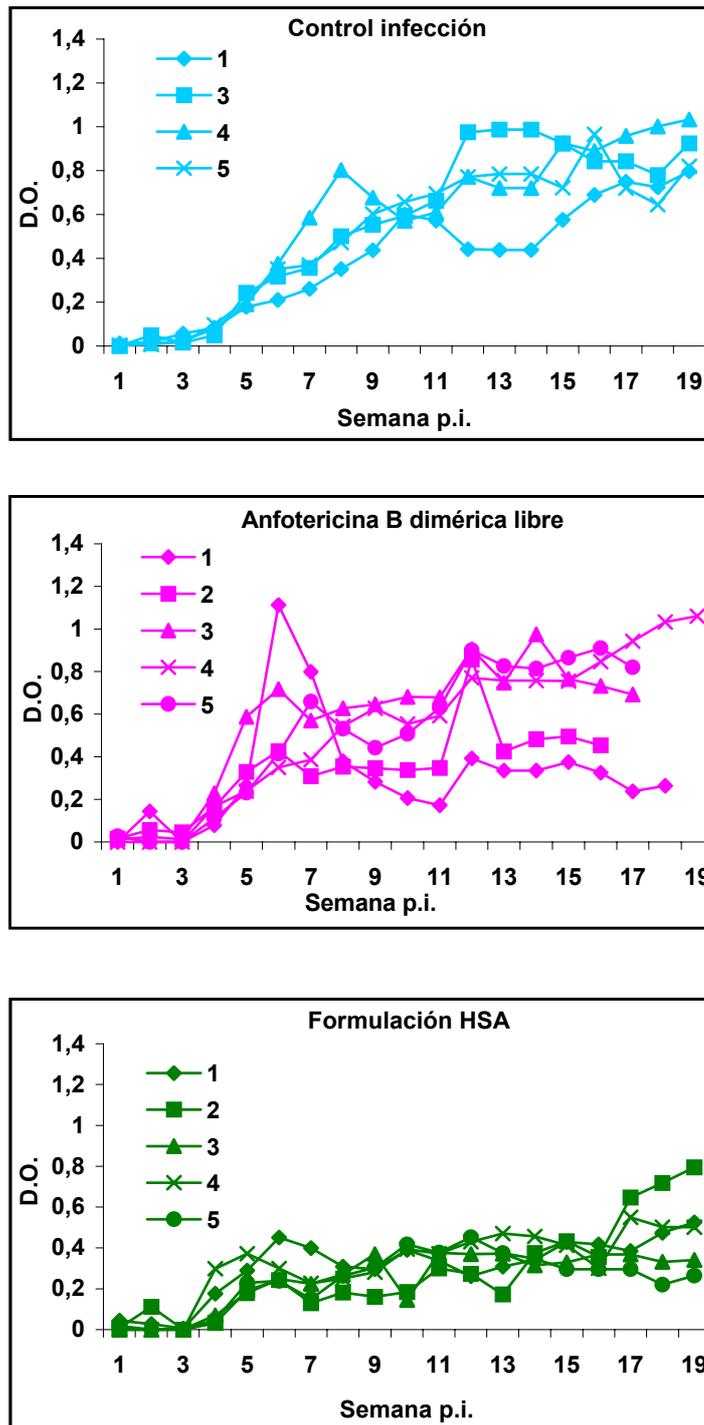
En el bazo y en el hígado existe reducción del número de parásitos en los dos lotes tratados con la anfotericina B, con respecto al control de infección (\*  $p < 0.05$ ), siendo esta reducción mayor en el tratado con la formulación de HSA. Hay que recordar que en el lote tratado con la anfotericina B libre, solamente el dato del animal 4 sería comparable con los del resto de los lotes, puesto que los otros animales murieron antes de lo previsto y sus cargas se determinaron, por lo tanto, unos días antes. Aún así, hemos calculado los valores medios de la carga en ese lote para obtener un dato orientativo y poder realizar una comparación aproximada.

**Tabla 14:** Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de cada lote respecto al control de infección.

	% REDUCCION DE LA CARGA PARASITARIA RESPECTO AL CONTROL INFECCION	
	Bazo	Hígado
Anfo B dimérica libre	32.24 *	17.17
Formulación	53.97 *	66.72 *

\*  $p < 0.05$

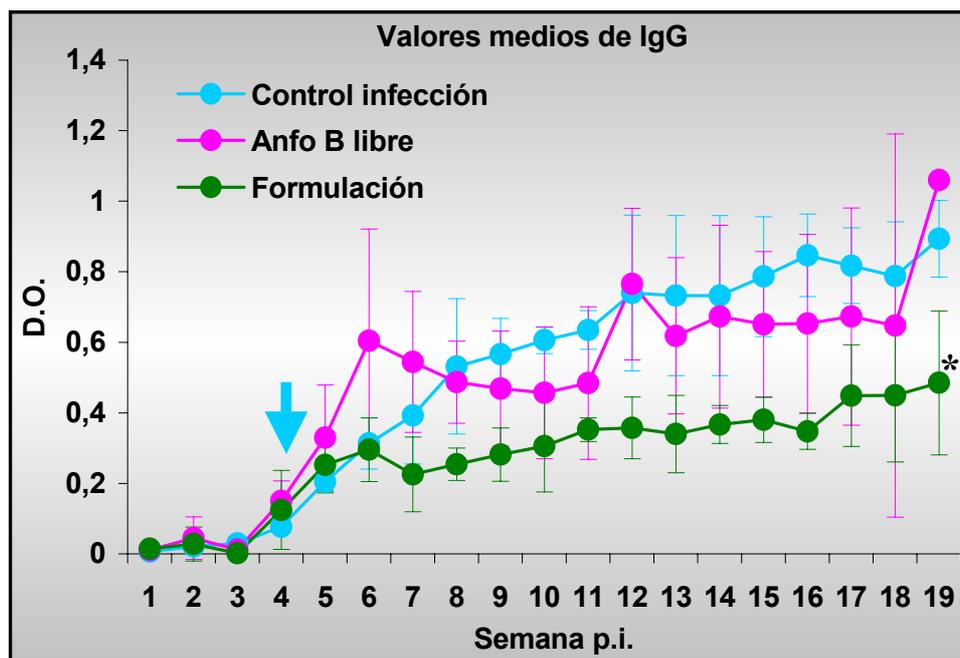
La eficacia de la nueva formulación es mayor que en el lote tratado con la forma libre en ambos órganos.



**Figura 15:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75 determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. Lote 1B: control de infección; Lote 2B: anfotericina B libre; Lote 3B: formulación de HSA.

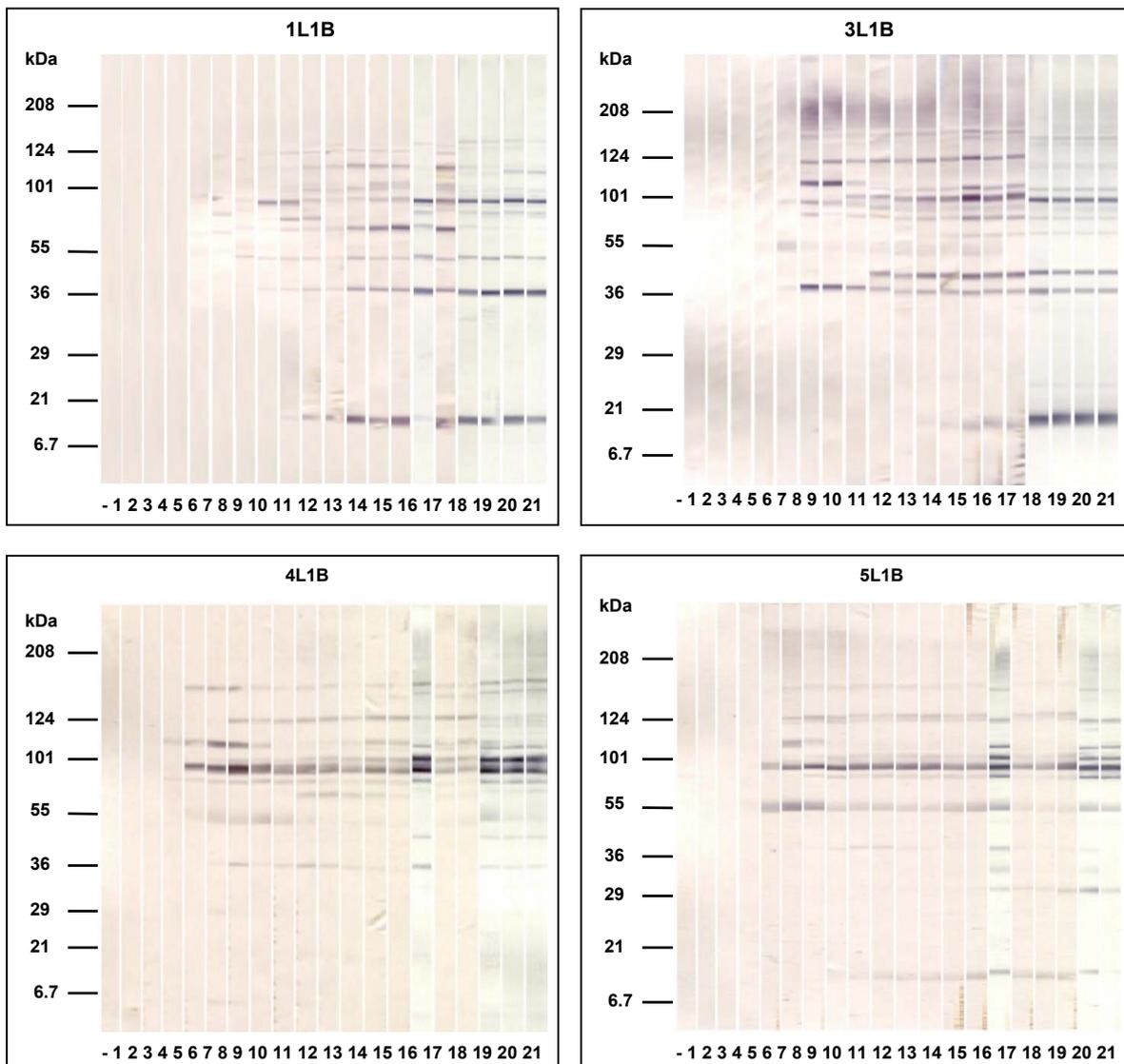
## Resultados

En el lote control de infección, encontramos un aumento progresivo de los niveles de anticuerpos frente al antígeno de *L. infantum* a lo largo del tiempo, llegando a alcanzar valores de D.O. de entre 0.7 y 1. Como ya habíamos visto anteriormente, la respuesta por anticuerpos se empieza a producir entre la 4ª y 5ª semana p.i. En el lote tratado con la formulación se observa una clara estabilización de los niveles de anticuerpos después del tratamiento, en comparación con los otros dos lotes.



**Figura 16:** Niveles medios de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, en los tres lotes sacrificados para el día 135 p.i., determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. La flecha indica la semana del tratamiento.

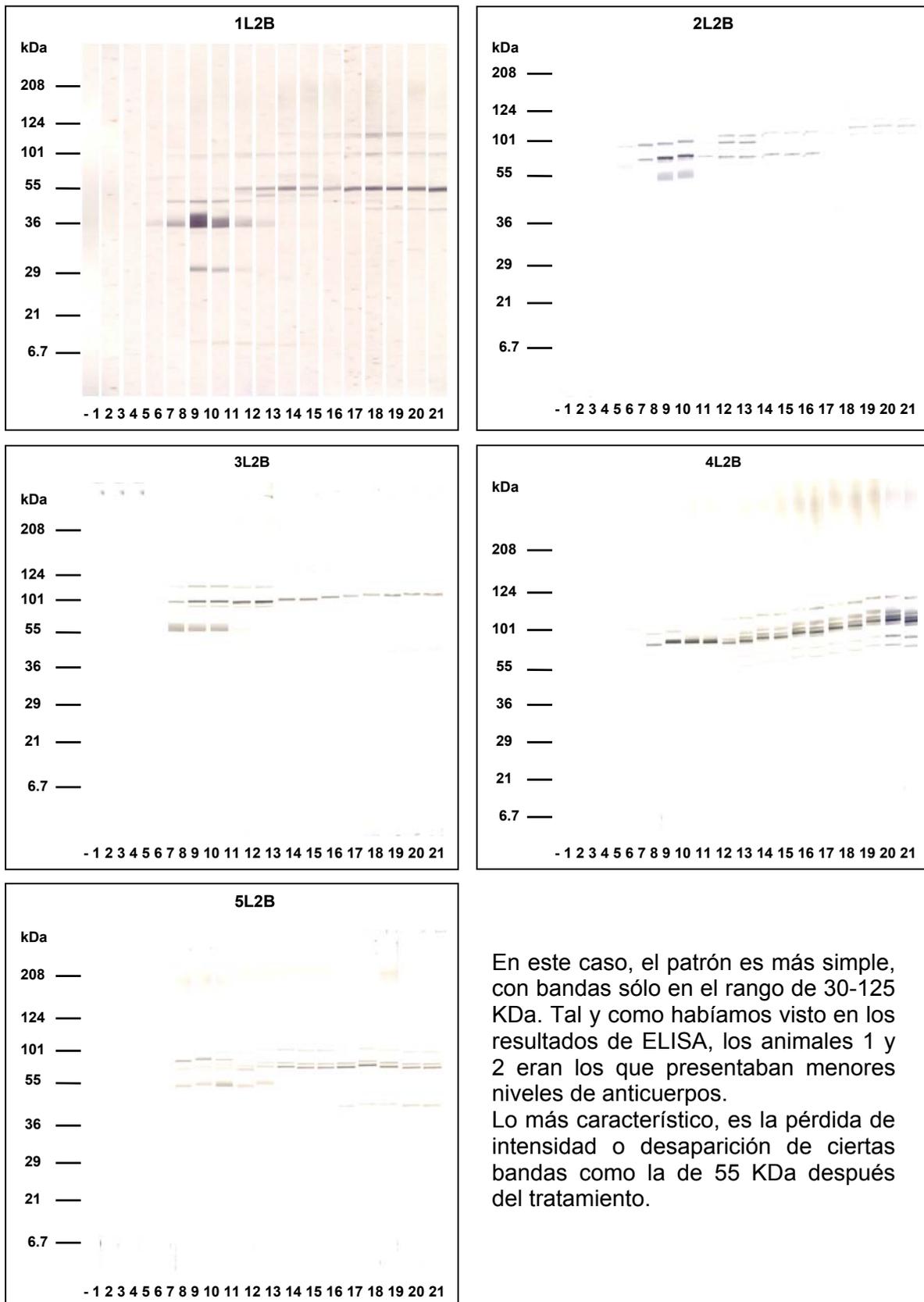
La gráfica de los valores medios muestra claramente una estabilización de los niveles de IgG en el lote tratado con la formulación de albúmina con respecto a los otros dos lotes (\*  $p < 0.05$ ). De nuevo, en el lote tratado con la anfotericina B libre se ha realizado una media de los valores de anticuerpos de todos los animales a pesar de que solo un animal sobrevivió hasta el final del experimento, para obtener una idea orientativa de lo que ha ocurrido en ese lote.



**Figura 17:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes al lote 1B: control de infección.

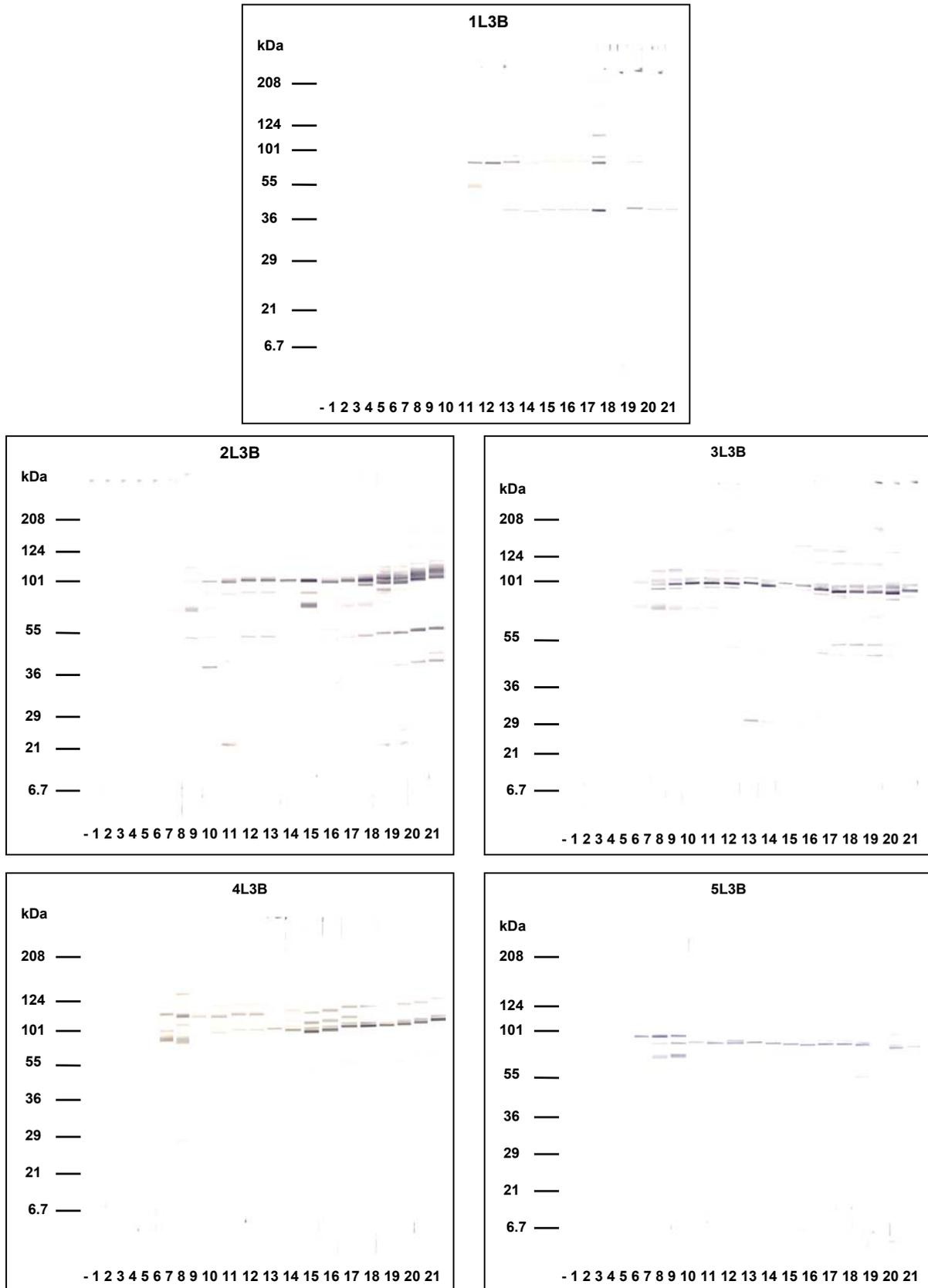
Los perfiles de reconocimiento antigénico en este lote muestran un patrón de entre 16 y 150 KDa, con variabilidad individual y heterogeneidad, comenzando la respuesta a partir de la semana 4<sup>a</sup> p.i. En todos los animales aparecen bandas con mayor o menor intensidad en el rango de 55-115 KDa. En los animales 1, 3 y 5 encontramos una banda de bajo peso molecular de 16 KDa.

## Resultados



En este caso, el patrón es más simple, con bandas sólo en el rango de 30-125 KDa. Tal y como habíamos visto en los resultados de ELISA, los animales 1 y 2 eran los que presentaban menores niveles de anticuerpos. Lo más característico, es la pérdida de intensidad o desaparición de ciertas bandas como la de 55 KDa después del tratamiento.

**Figura 18:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes al lote 2B: anfotericina B libre.



**Figura 19:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75, correspondientes al lote 3B: formulación de HSA.

## Resultados

En este caso, el patrón de reconocimiento también es menos complejo que en el lote control de infección, con bandas de entre 30 y 125 KDa. De nuevo, lo más destacado es la pérdida de intensidad o desaparición después del tratamiento de la banda de 55 KDa.

**Tabla 15:** Porcentaje de la subpoblación linfocitaria CD4+ en bazo, en el día 135 p.i.

Lote	Citometría	
	Animal	% CD4+
1B	1	46,85
	3	44,89
	4	43,37
	5	-
	Media	45.03 *
	DS	1.74
2B	1	-
	2	-
	4	34,07
	5	-
	Media	34.07
	DS	-
3B	1	61,14
	2	50,80
	3	-
	4	61,74
	5	51,67
	Media	56.33 *
DS	5.90	
Control sano	1	25.40
	2	32
	3	27.20
	Media	28.20
	DS	2.78

A día 135 p.i., en el lote control de infección todos los animales presentan porcentajes de células CD4+ similares y mayores a los del grupo de los controles sanos (\*  $p < 0.05$ ), aunque el animal 4 presenta mayor carga parasitaria que los otros. En el lote tratado con la anfotericina B dimérica libre solo tenemos el dato de un animal por lo que no podemos sacar conclusiones, aunque ese animal presenta niveles de anticuerpos altos. En el lote tratado con la formulación de HSA se ha producido un incremento en dicha población con respecto al control de infección (\*  $p < 0.05$ ). Los animales con mayor porcentaje de células CD4+ (el 1 y el 4) presentan más carga parasitaria en hígado, pero presentan niveles de anticuerpos intermedios dentro de su lote y hay que tener en cuenta que en este lote los anticuerpos se han estabilizado

después del tratamiento. El animal 5 que tiene carga similar al 4, sin embargo, presenta menos porcentaje de células CD4+ que él. También hay que señalar que desde el día 32 p.i. al día 135 p.i. se ha producido un incremento en esta subpoblación en todos los lotes.

**Tabla 16:** Índices de estimulación correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro*, frente a mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y antígenos (LEM75 y BCN150) el día 135 p.i. Se consideró que había existido proliferación cuando  $IE \geq 2$ .

Lote	Animal	Índices de estimulación (IE)			
		Mitógenos		Antígenos	
		Con A	Fitoh.	LEM75	BCN150
1B	1	1.45	1.32	1.39	0.63
	3	0.56	0.71	1.36	0.78
	4	0.48	0.37	0.44	0.80
	5	1.69	1.48	0.50	1.01
	Media	1.04	0.97	0.92	0.80
	DS	0.53	0.45	0.45	0.13
2B	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	0.87	0.24	0.41	0.11
	5	-	-	-	-
	Media	-	-	-	-
3B	1	3.60	0.49	1.06	0.045
	2	-	0.88	0.76	0.32
	3	1.24	1.04	0.4	0.31
	4	1.61	2.23	0.92	0.20
	5	1.95	0.47	0.44	0.17
	Media	1.99	1.02	0.72	0.21
Control sano	CS1	12.06	2.99	0.57	0.91
	CS2	4.71	2.7	0.78	0.65
	CS3	17.11	2.81	0.93	0.52
	Media	11.29	2.83	0.76	0.69
	DS	5.09	0.12	0.14	0.16

En este momento del sacrificio, las eficacias de la formulación de albúmina y de la anfotericina B libre son menores que a día 32 p.i., es decir, ha existido una recuperación parcial de la infección, por lo que seguimos encontrando una ausencia de respuesta proliferativa frente a mitógenos y antígenos en todos los lotes infectados debido, probablemente, a la existencia de un gran número de parásitos en ambos órganos. Solamente en las células del animal 1 del lote tratado con la formulación de albúmina existe proliferación frente a concanavalina A y en las células del animal 4

## Resultados

frente a fitohemaglutinina. Desgraciadamente, no hemos sacrificado animales en estadios intermedios entre el día 32 y 135 p.i., por lo que no sabemos qué ha ocurrido entre esos dos días.

### 2.3. Efecto de las microesferas de HSA vacías.

Esta prueba se realizó para comprobar que las microesferas de albúmina sérica humana *per se* (vacías) no ejercían ningún efecto sobre el parásito, ni sobre la respuesta inmune. Para ello se dispusieron dos lotes homogéneos de 8 cricetos machos cada uno:

**Lote 1:** Control de infección.

**Lote 2:** Microesferas de HSA vacías.

Las microesferas vacías se administraron los días **25, 27 y 29 p.i.** Al igual que en el caso anterior, la mitad de los animales fueron sacrificados el día 32 p.i y la otra mitad el día 135 p.i. Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 17:** Pesos de los animales y de los órganos en gramos, en el día del sacrificio (día 32 p.i.).

Día 32 p.i.		Pesos en el día del sacrificio		
Lote	Animal	Criceto	Peso Bazo	Peso Hígado
Control infección	1	96,45	0,39	4,33
	2	101,60	0,21	5,74
	3	94,18	0,17	5,89
	4	104,02	0,15	5,05
	Media	99,06	0,23 *	5,25
	DS	4,53	0,11	0,72
Microesferas vacías	1	91,22	0,34	5,12
	2	103,88	0,23	5,31
	3	102,22	0,36	5,45
	4	88,73	0,18	4,43
	Media	96,51	0,28 *	5,08
	DS	7,65	0,09	0,45
Control sano	1	92,39	0,09	3,95
	2	116,36	0,12	6,35
	Media	104,38	0,11	5,15
	DS	16,95	0,02	1,70

El peso de los animales es igual en ambos lotes infectados y ligeramente menor que en el grupo de los controles sanos. No existen diferencias entre el peso de los bazo en ambos lotes, pero si se observa un incremento del tamaño del bazo respecto a los animales sanos (\*  $p < 0.05$ ). En cuanto al hígado, no se observan diferencias en ningún caso.

**Tabla 18:** Pesos de los animales y de los órganos en gramos, en el día del sacrificio (día 135 p.i.).

Día 135 p.i.		Pesos en el día del sacrificio		
Lote	Animal	Peso animal	Peso Bazo	Peso Hígado
Control infección	5	126,40	1,29	8,32
	6	93,10	0,79	6,70
	7	116,90	0,88	7,60
	8	122,20	0,66	7,41
	Media	114,65 *	0,91 *	7,51 *
	DS	14,88	0,27	0,67
Microesferas vacías	5	93,70	0,86	5,84
	6	83,95	0,64	5,86
	7	114,90	1,02	7,25
	8	96,60	0,54	5,87
	Media	97,29 *	0,77 *	6,21
	DS	12,93	0,22	0,70
Control sano	3	112,40	0,24	5,89
	4	134	0,10	6,76
	Media	123,20	0,17	6,33
	DS	15,27	0,10	0,62

A día 135 p.i., los dos lotes infectados presentan de nuevo menor peso que los controles sanos (\*  $p < 0.05$ ) y el lote tratado con las microesferas vacías presenta menor peso que el lote control de infección. En ambos lotes infectados existe un marcada esplenomegalia con respecto a los animales sanos (\*  $p < 0.05$ ), siendo el valor medio del peso de los bazo un poco menor en el lote tratado con las microesferas vacías. El peso de los hígados es mayor en el lote control de infección que en los otros dos grupos (\*  $p < 0.05$ ).

## Resultados

**Tabla 19:** Carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, tanto en bazo como en hígado, en el día 32 p.i.

Día 32 p.i.		Amastigotes/mg órgano (x 10 <sup>6</sup> )	
Lote	Animal	Bazo	Hígado
Control infección	1	0.116	0.067
	2	0.523	0.282
	3	0.021	0.032
	4	0.174	0.009
	Media	<b>0.208</b>	<b>0.097</b>
	DS	<b>0.189</b>	<b>0.108</b>
Microesferas vacías	1	0.149	0.215
	2	0.043	0.087
	3	0.297	0.083
	4	0.299	0.016
	Media	<b>0.197</b>	<b>0.100</b>
	DS	<b>0.107</b>	<b>0.072</b>

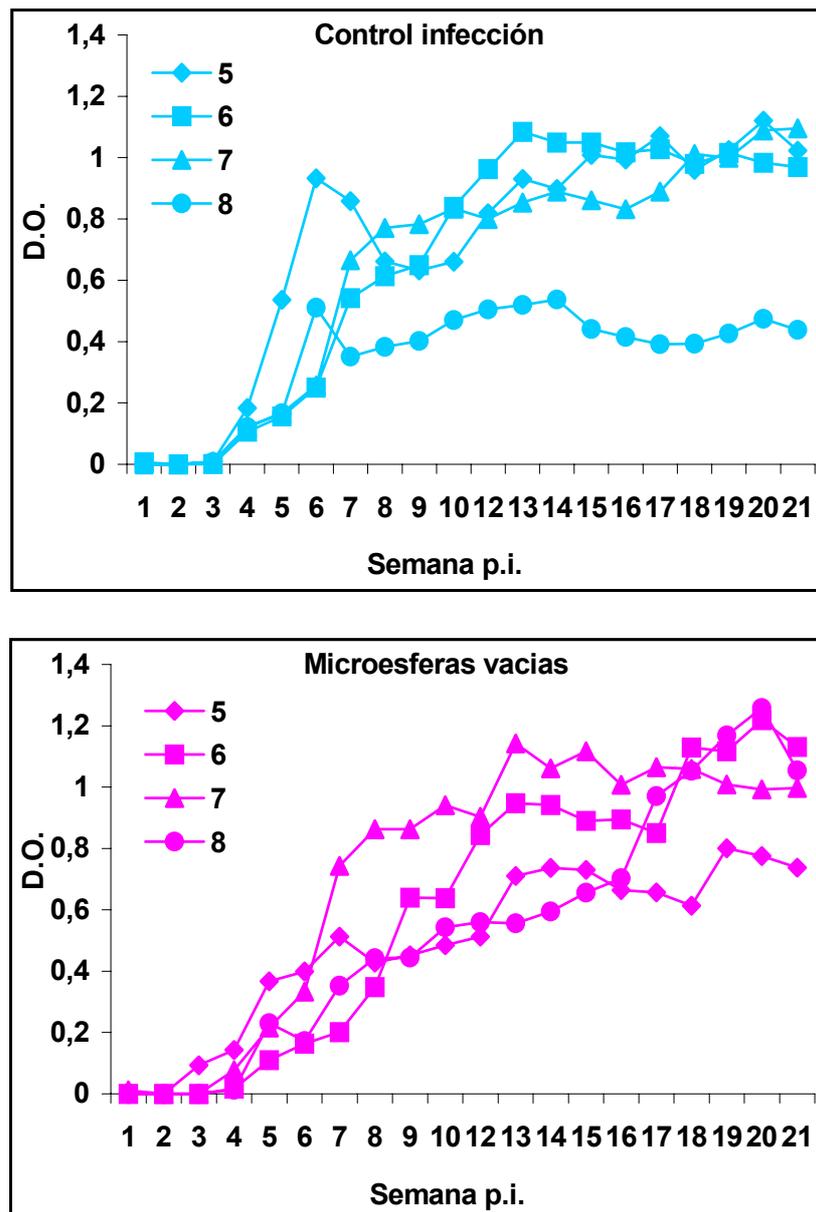
No se aprecian diferencias significativas en la carga parasitaria de ambos lotes, en ninguno de los dos órganos.

**Tabla 20:** Carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, tanto en bazo como en hígado, en el día 135 p.i.

Día 135 p.i.		Amastigotes/mg órgano (x 10 <sup>6</sup> )	
Lote	Animal	Bazo	Hígado
Control infección	5	0.074	0.030
	6	2.560	1.220
	7	6.090	0.011
	8	0.465	0.028
	Media	<b>2.297</b>	<b>0.322</b>
	DS	<b>2.380</b>	<b>0.518</b>
Microesferas vacías	5	0.174	0.081
	6	3.340	0.117
	7	1.670	0.112
	8	4.830	0.920
	Media	<b>2.503</b>	<b>0.307</b>
	DS	<b>1.740</b>	<b>0.353</b>

En este caso tampoco existen diferencias entre ambos lotes.

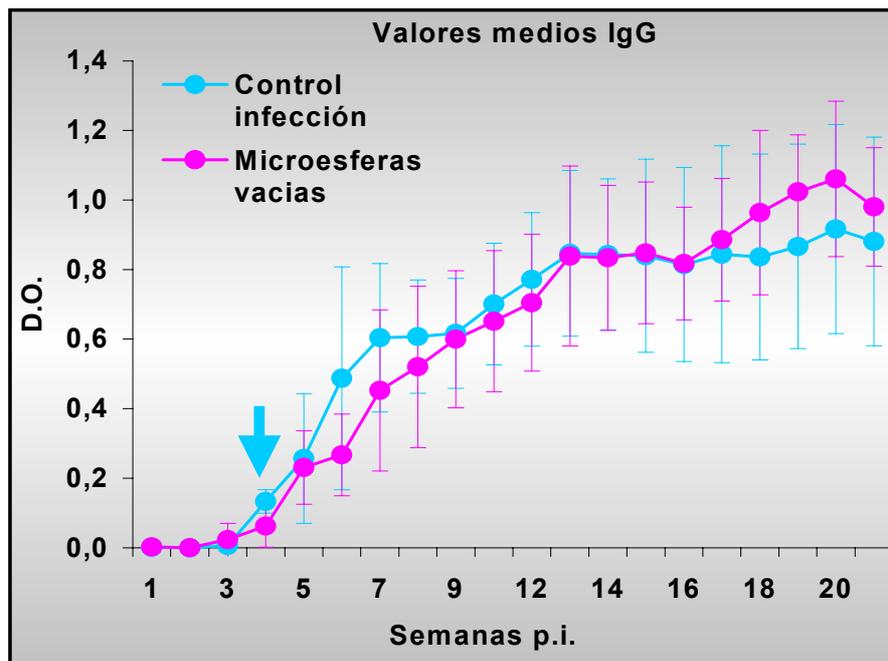
No se realizaron pruebas de ELISA, ni de western-blot a día 32 p.i. puesto que, como ya se vio en el experimento anterior, no aportaban gran información, ya que al ser un estadio más temprano de la infección, casi no hay respuesta por anticuerpos.



**Figura 20:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, determinados mediante ELISA indirecto para los animales sacrificados el día 135 p.i. **D.O.:** D.O. p-D.O.n. Lote 1: control de infección; Lote 2: microesferas de HSA vacias.

## Resultados

En el lote 1, excepto el animal 8, que presenta un valor de D.O. de entre 0.4 y 0.5 en las últimas semanas, los demás animales presentan respuesta altas por IgG llegando a alcanzar valores de D.O. mayores de 1. En el lote 2, todos los animales presentan valores de D.O. de alrededor de 1, excepto el animal 5 que solo alcanza valores de 0.7 en las últimas semanas.



**Figura 21:** Niveles medios de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. La flecha indica la semana del tratamiento.

No se aprecian diferencias significativas en los niveles de IgG entre los dos lotes.

Tampoco encontramos diferencias en los perfiles de reconocimiento antigénico entre los dos lotes (datos no mostrados).

**Tabla 21:** Índices de estimulación correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro* frente a mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y antígenos (LEM75 y BCN150) el día 135 p.i. Se consideró que había existido proliferación cuando  $IE \geq 2$ .

		Índices de estimulación a día 135 p.i.			
		Mitógenos		Antígenos	
Lote	Animal	Con A	Fit.	LEM75	BCN150
Control infección	5	1.30	2.44	1.31	0.35
	6	0.94	0.45	0.79	0.65
	7	0.26	0.25	0.33	0.24
	8	0.26	0.27	0.30	0.21
	<b>Media</b>	<b>0.69</b>	<b>0.85</b>	<b>0.68</b>	<b>0.36</b>
	<b>DS</b>	<b>0.44</b>	<b>0.91</b>	<b>0.41</b>	<b>0.17</b>
Microesferas vacías	5	1.51	0.62	0.39	0.73
	6	1.05	1.41	1.01	2.19
	7	1.03	0.64	1.82	1.11
	8	0.75	0.84	0.86	0.93
	<b>Media</b>	<b>1.085</b>	<b>0.87</b>	<b>1.02</b>	<b>1.24</b>
	<b>DS</b>	<b>0.27</b>	<b>0.31</b>	<b>0.51</b>	<b>0.56</b>
Control sano	3	8.33	3.03	1.68	1.70
	4	15.79	3.00	0.87	2.07
	<b>Media</b>	<b>12.06</b>	<b>3.015</b>	<b>1.27</b>	<b>1.88</b>
	<b>DS</b>	<b>3.73</b>	<b>0.015</b>	<b>0.40</b>	<b>0.18</b>

Tanto frente a mitógenos, como frente a antígenos, existe una clara inhibición de la proliferación celular con respecto al grupo de los animales sanos en los dos lotes infectados.

En cuanto a la población de linfocitos CD4+, no existieron diferencias significativas entre ambos lotes, ni a día 32, ni a día 135 p.i. (datos no mostrados).

### **3. TRATAMIENTO EN EL PERIODO SINTOMATICO CON ANFOTERICINA B FORMULADA EN HSA, A LA DOSIS DE 2 mg/Kg/día. ESTUDIO DE LOS ESTADOS DE AGREGACION.**

Los resultados del experimento anterior mostraban que la formulación de albúmina conteniendo anfotericina B era más eficaz que la anfotericina B de referencia libre. Sin embargo, la utilización de una pauta de administración en fase temprana, a pesar de ser eficaz a día 32 p.i., no era lo suficientemente buena como para controlar o eliminar la infección en estadios más tardíos (día 135 p.i.). Además, en el tratamiento temprano no se puede conocer el grado de infección en el que se encuentran los animales. Por ello en este experimento se modificó el planteamiento de trabajo:

- Se realizó el tratamiento en el **periodo sintomático** de la enfermedad, una vez comprobado que todos los animales alcanzaban ese periodo mediante determinaciones por ELISA de los niveles de IgG en las semanas 7<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> p.i. Se consideró que los animales se encontraban ya en dicho periodo cuando se comenzaban a apreciar síntomas de enfermedad y además, los niveles de D.O. en esas semanas eran de entre 0.3 y 0.4.
- Se aumentó la dosis de anfotericina B de 1 mg/Kg/día a **2 mg/Kg/día**.
- Se probó la formulación de albúmina sérica humana (HSA) con la anfotericina B en sus distintos estados de agregación: **dimérico, poliagregado y monomérico** y se comparó con la anfotericina B de referencia libre en estado dimérico, estado de agregación que presenta la especialidad farmacéutica comercial (Fungizona<sup>®</sup>).

El experimento se realizó de la siguiente manera: se infectaron 30 cricetos machos, con 10<sup>7</sup> promastigotes de “reciente aislamiento” de la cepa BCN150 de *L. infantum*, por vía intracardiaca. Antes del tratamiento, los animales fueron agrupados en 5 lotes homogéneos de 5 animales cada uno, basándose en los síntomas externos y en los niveles de anticuerpos. Los animales sobrantes se emplearon para mantenimiento del parásito. El tratamiento con las distintas formulaciones se realizó en

## **Resultados**

tres días alternos: **69, 71 y 73 p.i.**, por vía intracardiaca a la dosis de 2 mg/Kg/día y el sacrificio en los días **145-146 p.i.** Los lotes fueron los siguientes:

**Lote 1:** Control de infección.

**Lote 2:** Anfotericina B de referencia en estado de agregación **dimérico**.

**Lote 3:** Anfotericina B de referencia en estado **dimérico**, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 4:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado**, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 5:** Anfotericina B de referencia en estado **monomérico**, formulada en microesferas de HSA.

En el lote 2 murió el animal 1 y en el lote 3 murieron los animales 1 y 2 durante la semana del tratamiento. Hemos decidido no incluir los datos de pesos y niveles de anticuerpos (no se determinaron ni la carga parasitaria, ni los ensayos celulares) de los animales que murieron, para que así todos los valores en las distintas pruebas siempre correspondan a grupos de animales que sobrevivieron durante todo el proceso y poder obtener valores medios reales.

**Tabla 22:** Pesos de los animales en gramos a lo largo del experimento; se incluyó un grupo de controles sanos, es decir, no infectados con el parásito.

		Pesos de los animales a lo largo del experimento								
		Semana p.i.								
Lote	Animal	Preinf.	3 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
Control infección	1	60.60	73	91	100	108	104	103	104	98
	2	72.50	83	98	104	110	113	101	82	75
	3	70	78.80	98.40	109	118	123	122	111	102
	4	63.70	73	82.30	90.30	96	98	97	98	95
	5	66.70	77	89	97.60	105	107	108	114	112
	Media	70	76,50	92,67	104,33	107,40	109	106,20	101,80*	96,40*
	DS	4,76	4,73	4,73	4,51	7,99	9,51	9,68	12,70	13,58
Anfo B dimérica libre	2	61	74	92	101	100	104	108	110	107
	3	70	81	93	101	99	103	106	109	108
	4	69	76	87	94	95	97	101	100	102
	5	68	82	91	98	90	98	99	89	82
	Media	67	78,25	90,75	98,50	96*	100,50*	103,50*	102*	99,75*
	DS	4,08	3,86	2,63	3,32	4,55	3,51	4,20	9,76	12,12
	3	60	76	89	95	92	98	105	101	107
Anfo B dimérica HSA	4	67.80	80	92	100	100	104	113	108	110
	5	61	81	98.50	107	104	108	115	111	112
	Media	62,93	79	93,17	100,67	98,67*	103,33*	111	106,67*	109,67*
	DS	4,24	2,65	4,86	6,03	6,11	5,03	5,29	5,13	2,52
Anfo B poliagregada HSA	1	60.40	72	87.30	99	99	103	104	105	109
	2	56	73	82	87	90	93	99	101	103
	3	63	75.50	89	85	98	103	107	109	108
	4	77	86	96	100	102	103	108	110	110
	5	65	80	93.50	100	104	106	108	103	106
	Media	65,25	77,75	89	94,20	98,60*	101,6*	105,20	105,60*	107,20*
	DS	8,73	6,55	7,00	7,53	5,37	4,98	3,83	3,85	2,77
Anfo B monomérica HSA	1	72.60	88	100	104	102	106	110	111	103
	2	65.80	83	95.20	101	101	108	115	115	120
	3	74.80	92	105	113	106	115	125	120	123
	4	65	86	102.40	104	101	105	115	111	113
	5	71.50	90	101.50	109	111	113	118	120	114
	Media	69,94	87,80	100,82	106,20	104,20	109,40	116,60	115,40	114,60
	DS	4,32	3,49	3,63	4,76	4,32	4,39	5,50	4,51	7,70
Controles sanos	1	68	75	99	107	116	118	113	122	127
	2	62	70	83	94	102	100	100	112	117
	3	60	68	79	87	96	106	108	102	107
	Media	63.30	71	87	96	104.66	108	107	112	117
	DS	3.39	2.94	8.60	8.28	8.37	7.48	5.35	8.16	8.16

En el grupo de animales sanos, el peso va aumentando progresivamente hasta alcanzar valores medios de 117 gramos en la última semana. En el lote control de infección el peso va aumentando progresivamente hasta la semana 13<sup>a</sup>, a partir de la cual empieza a disminuir (\*  $p < 0.05$ ), con valores medios de 96 gramos en la última semana. En el lote de animales tratados con la anfotericina B de referencia en estado dimérico el peso aumenta hasta las semanas 11<sup>a</sup>-13<sup>a</sup> y luego disminuye o se mantiene

## Resultados

con valores medios de 100 gramos en la última semana (\*  $p < 0.05$ ). En los lotes tratados con la anfotericina B en estado dimérico, poliagregado o monomérico encapsulada en HSA, los pesos aumentan hasta la semana 15ª y luego se mantienen con valores medios de 109, 107 y 115 gramos, respectivamente, en el momento del sacrificio, y siendo menores que en el grupo sano en algunas semanas (\*  $p < 0.05$ ).

**Tabla 23:** Pesos de los órganos (bazo e hígado) en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, en el día del sacrificio.

Lote	Animal	Pesos órganos		Amastigotes/mg órgano (x 10 <sup>9</sup> )	
		Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
Control infección	1	1	5.70	1.208	4.092
	2	0.74	5.05	1.079	8.585
	3	0.79	7.13	1.301	12.10
	4	1.10	6.55	1.581	5.97
	5	1.11	8.02	0.406	3.78
	<b>Media</b>	<b>0.95 *</b>	<b>6.49 *</b>	<b>1.115</b>	<b>6.9</b>
	<b>DS</b>	<b>0,17</b>	<b>1,17</b>	<b>0.390</b>	<b>3.11</b>
Anfo B dimérica libre	2	0.66	6.50	0.328	2.83
	3	0.83	6.42	0.255	2.131
	4	1.01	6.27	0.652	3.26
	5	0.67	5.06	0.36	2.8
	<b>Media</b>	<b>0.82 *</b>	<b>6.06</b>	<b>0.398 *</b>	<b>2.75 *</b>
	<b>DS</b>	<b>0,21</b>	<b>0,68</b>	<b>0.151</b>	<b>0.403</b>
	Anfo B dimérica HSA	3	0.34	5.17	0
4		0.30	6.27	0.00022	0
5		0.91	6.08	0.407	0.364
<b>Media</b>		<b>0.52 *</b>	<b>5.84</b>	<b>0.135 *</b>	<b>0.121 *</b>
<b>DS</b>		<b>0,34</b>	<b>0,59</b>	<b>0.191</b>	<b>0.171</b>
Anfo B poliagregada HSA	1	0.34	5.75	0.00442	0.03335
	2	0.58	5.15	0.01078	0.08652
	3	0.46	5.58	0.001564	0.0145
	4	0.52	5.71	0.00079	0.01359
	5	0.58	6.48	0.548	1.264
	<b>Media</b>	<b>0.50 *</b>	<b>5.73</b>	<b>0.113 *</b>	<b>0.282 *</b>
	<b>DS</b>	<b>0,10</b>	<b>0,48</b>	<b>0.217</b>	<b>0.491</b>
Anfo B monomérica HSA	1	0.74	6.16	0.896	2.78
	2	0.56	5.60	0.099	1.299
	3	0.75	8.16	0.694	2.76
	4	0.90	7.08	1.033	8.028
	5	0.98	7.32	1.317	8.081
	<b>Media</b>	<b>0.79 *</b>	<b>6.86 *</b>	<b>0.807 *</b>	<b>4.58 *</b>
	<b>DS</b>	<b>0,16</b>	<b>1,00</b>	<b>0.408</b>	<b>2.87</b>
Control sano	1	0.17	5.60	-	-
	2	0.14	5.17	-	-
	3	0.16	5.23	-	-
	<b>Media</b>	<b>0.15</b>	<b>5.33</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
	<b>DS</b>	<b>0.01</b>	<b>0.19</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Existe una marcada esplenomegalia en todos los lotes infectados con *L. infantum* respecto al grupo de los controles sanos (\*  $p < 0.05$ ). Esta esplenomegalia es mayor en el lote control de infección, en el lote tratado con la anfotericina B de referencia dimérica libre y en el lote tratado con la anfotericina B monomérica encapsulada en albúmina. En cuanto al hígado, los pesos son mayores a los del grupo sano, en el lote control de infección y en el tratado con la formulación de HSA monomérica (\*  $p < 0.05$ ). El aspecto macroscópico de los órganos era mejor en el lote tratado con la formulación conteniendo anfotericina B poliagregada y a pesar de existir una alta eficacia en el lote tratado con la formulación de anfotericina B dimérica, los órganos de estos animales presentaban un aspecto más blanquecino y necrosado, debido posiblemente a una mayor toxicidad.

Respecto a la carga parasitaria, existe como siempre variabilidad individual, pero los valores medios muestran que en el bazo, existe menor carga parasitaria en el lote tratado con la anfotericina B poliagregada encapsulada (\*  $p < 0.05$ ), dimérica encapsulada (\*  $p < 0.05$ ), dimérica libre (\*  $p < 0.05$ ) y monomérica encapsulada (\*  $p < 0.05$ ) en ese orden, respecto al control de infección. En el hígado, los valores medios muestran que existe menor carga con respecto al control de infección en el lote tratado con la anfotericina B dimérica encapsulada (\*  $p < 0.05$ ), poliagregada encapsulada (\*  $p < 0.05$ ), dimérica libre (\*  $p < 0.05$ ) y monomérica encapsulada (\*  $p < 0.05$ ) en ese orden.

**Tabla 24:** Porcentaje de reducción de la carga parasitaria en los lotes tratados respecto al control de infección, tanto en bazo como en hígado.

	% REDUCCION DE LA CARGA PARASITARIA RESPECTO AL CONTROL INFECCION	
	Bazo	Hígado
Anfo B dimérica libre	64.30 *	60.14 *
Dimérica HSA	87.89 *	98.24 *
Poliagregada HSA	89.86 *	95.91 *
Monomérica HSA	27.62 *	33.62 *

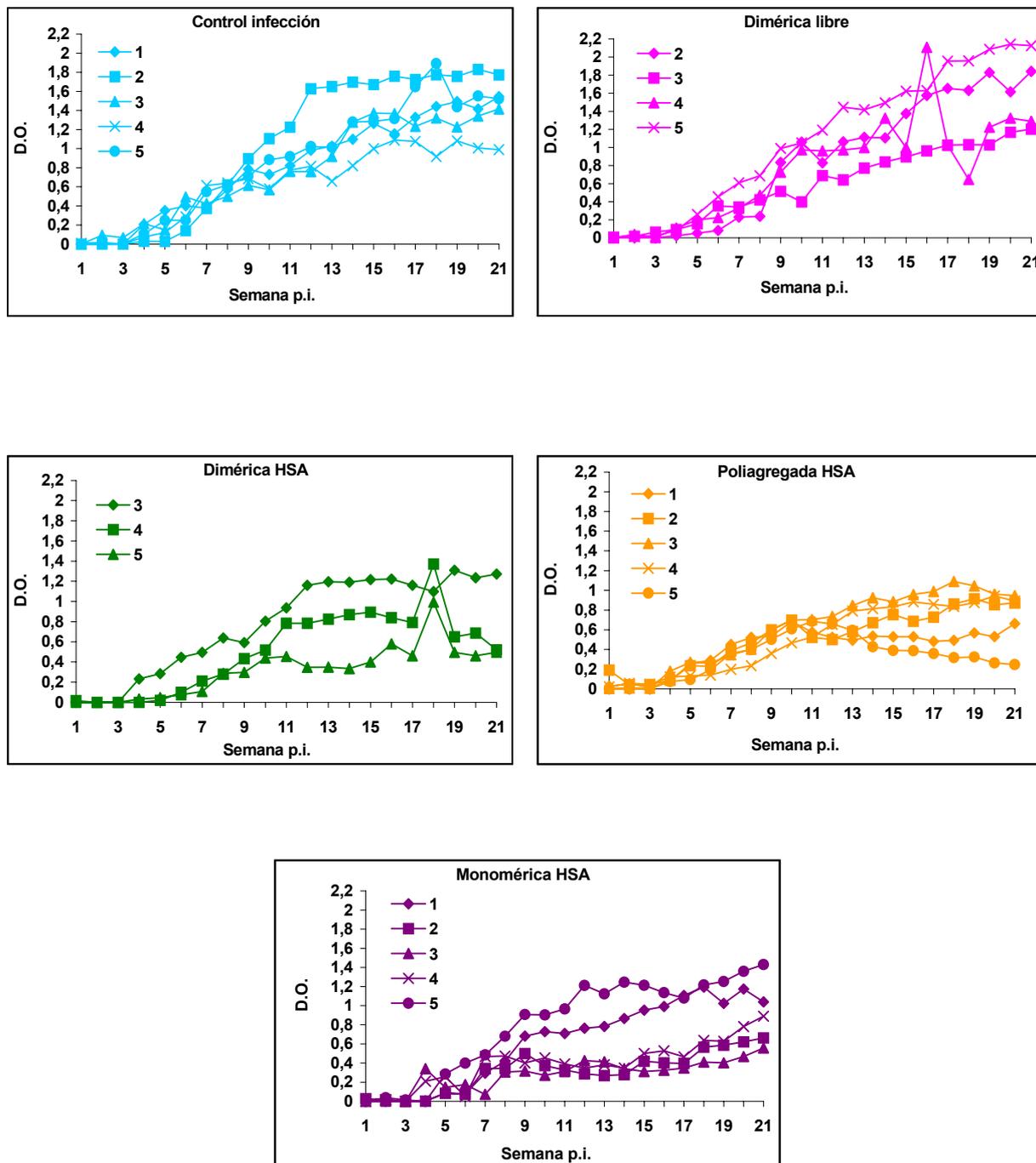
\*  $p < 0.05$ .

Las mayores eficacias las encontramos en los lotes tratados con las formulaciones dimérica y poliagregada encapsuladas, seguidas de la anfotericina B dimérica libre y de la formulación monomérica encapsulada. Por lo tanto, descartamos la anfotericina B monomérica encapsulada para próximos experimentos. Además,

## **Resultados**

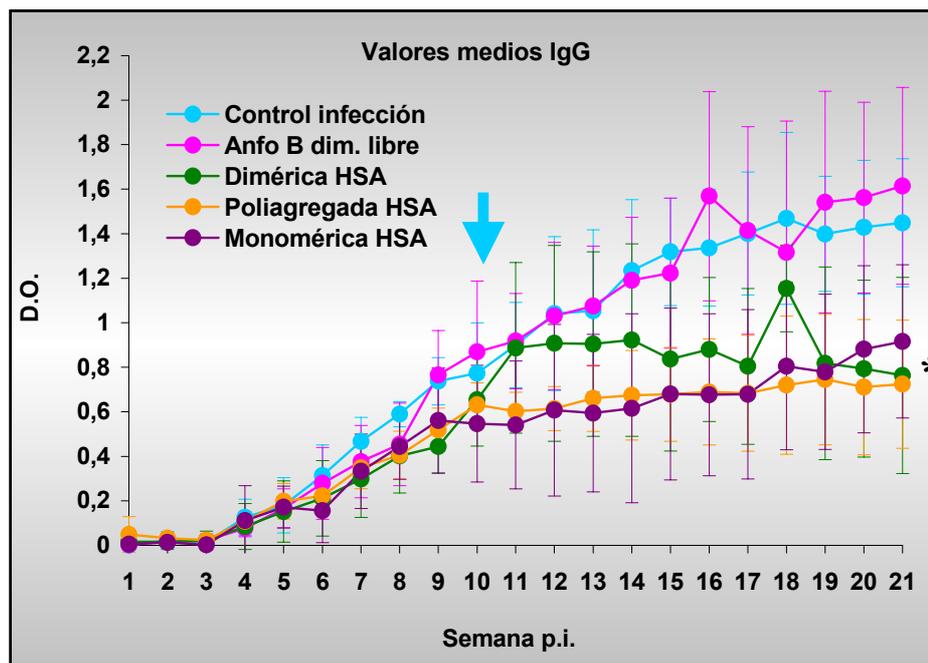
pensamos que entre las formulaciones dimérica y poliagregada encapsulada, ésta última podría ser mejor, ya que en el lote de los animales tratados con la formulación dimérica encapsulada murieron dos animales en el momento del tratamiento y esto podría ser debido a un mayor efecto tóxico, tal y como habíamos señalado en el experimento en el que se empleó la dosis de 1 mg/Kg/día, en fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, en el lote tratado con la formulación poliagregada encapsulada sobrevivieron todos los animales hasta el final del experimento.

Para confirmar la mayor toxicidad de la formulación dimérica, se efectuó de nuevo el tratamiento en otros 6 cricetos infectados y se volvió a producir la muerte en 3 de ellos (datos no mostrados).



**Figura 22:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, determinados mediante ELISA indirecto. **D.O.:** D.O. p-D.O. n. Lote 1: control de infección; Lote 2: anfotericina B dimérica libre; Lote 3: anfotericina B dimérica formulada en HSA; Lote 4: anfotericina B poliagregada formulada en HSA; Lote 5: anfotericina B monomérica formulada en HSA.

## Resultados

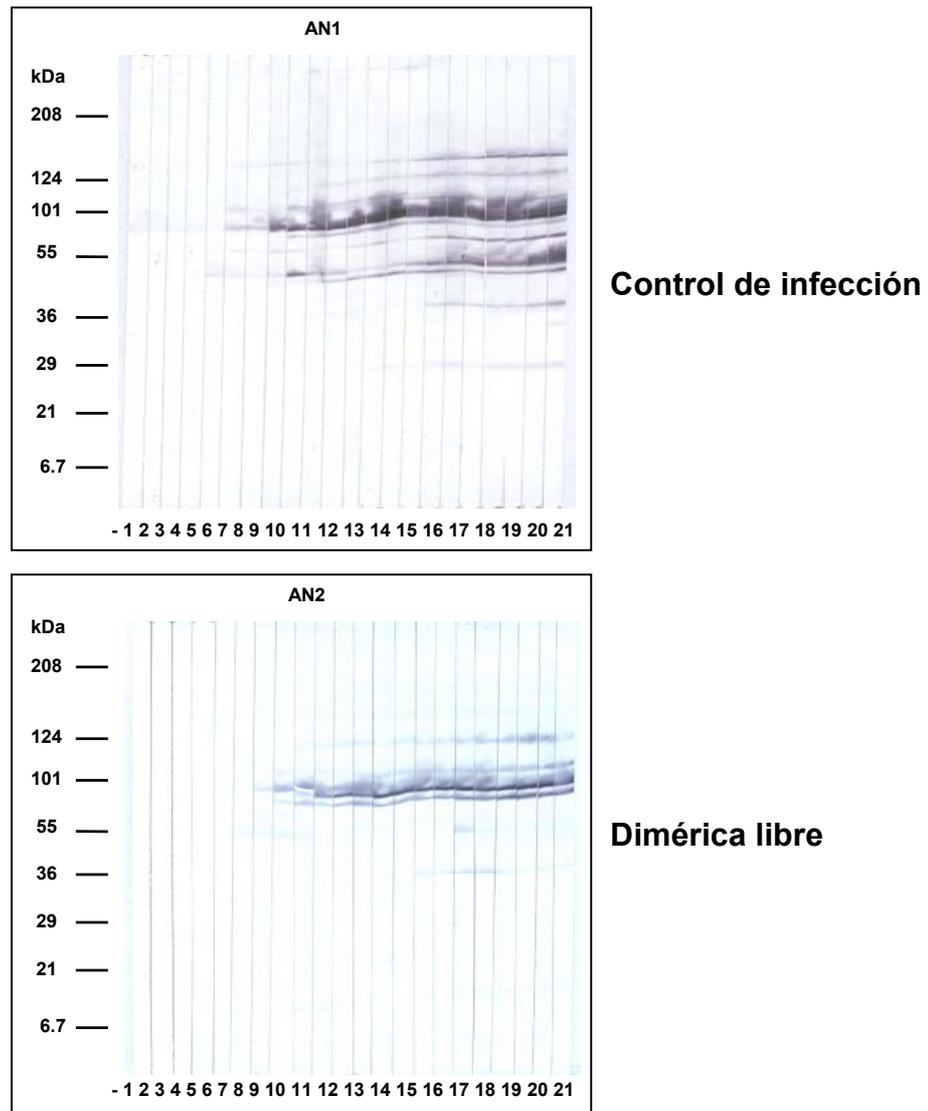


**Figura 23:** Niveles medios de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, en todos los lotes, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. La flecha indica la semana del tratamiento.

Los valores medios muestran que la anfotericina B dimérica libre presenta niveles de anticuerpos similares a los encontrados en el lote control de infección. En el lote tratado con la formulación de HSA conteniendo anfotericina B dimérica disminuyen los anticuerpos después del tratamiento (\*  $p < 0.05$ ), pero este descenso es un poco menor que el producido en los lotes tratados con las formulaciones de anfotericina B poliagregada y monomérica (\*  $p < 0.05$ ). Aunque en este experimento los datos de la carga parasitaria son un poco más homogéneos, sigue existiendo una gran variabilidad y resulta muy difícil establecer una correlación individual entre la carga parasitaria y los niveles de anticuerpos. Basándonos en los valores medios, se observa mejor correlación entre la eficacia y los niveles de IgG, aunque la formulación monomérica, que es la menos eficaz, también produce descenso en los niveles de anticuerpos después del tratamiento.

Seguimos pensando que la formulación de anfotericina B poliagregada formulada en HSA es la mejor porque, aunque presenta eficacia similar a la anfotericina B dimérica formulada en HSA, produce una mayor disminución en los niveles de anticuerpos.

Aunque se han realizado los western-blots de todos los animales, para abreviar, en éste y sucesivos experimentos, solo mostraremos el western-blot de un animal representativo por cada lote.

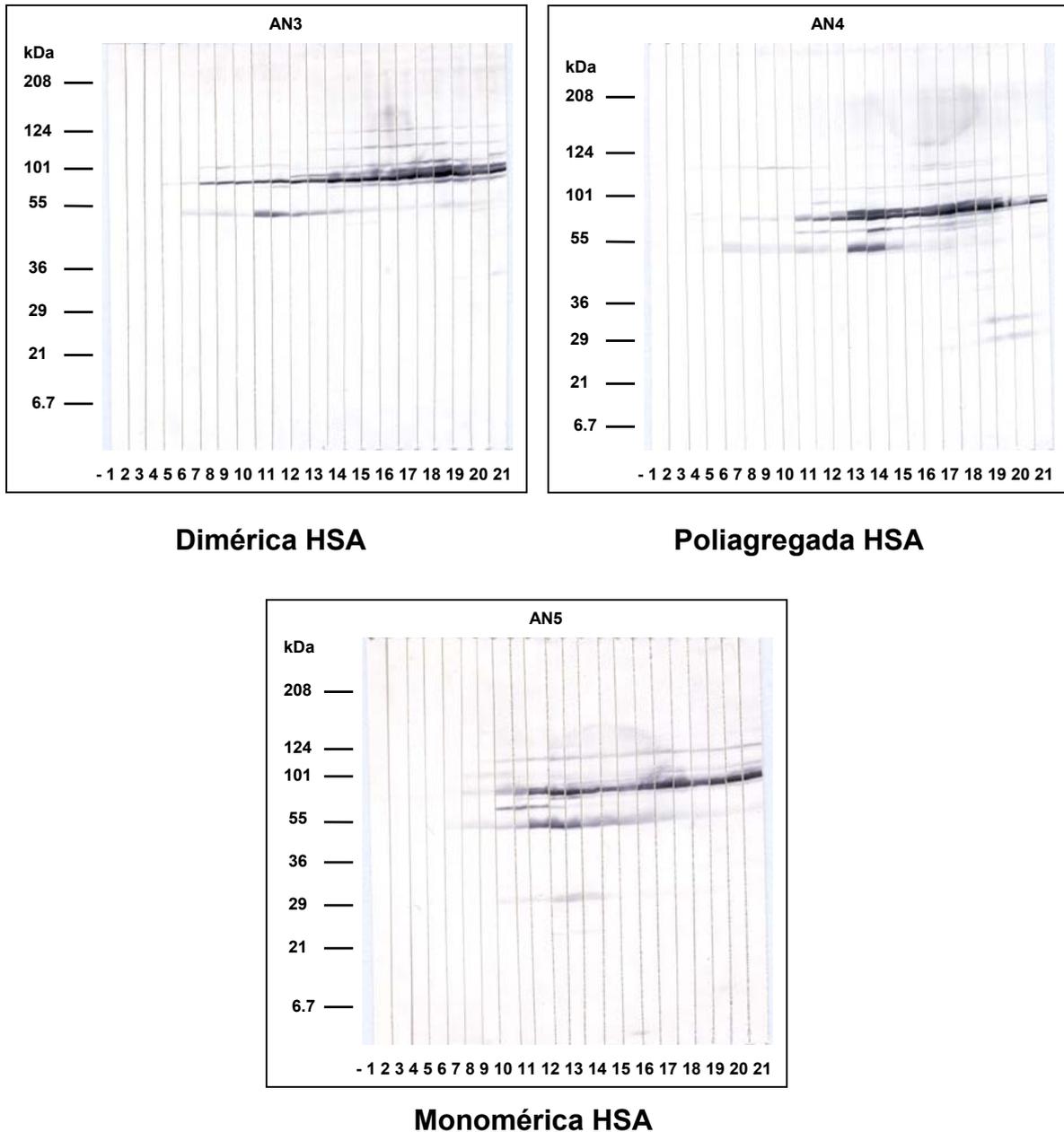


**Figura 24:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75. Lote 1: control de infección; Lote 2: anfotericina B dimérica libre.

En el lote control de infección las bandas más frecuentes son las de 30, 40, 50-55, 60, 70, 80-90, 115 y 125 KDa, con aparición de la respuesta a partir de la semana 6<sup>a</sup>-7<sup>a</sup> p.i. En lote tratado con la anfotericina B dimérica libre desaparecen bandas por encima y por debajo de los 90-100 KDa, que en algunos animales vuelven a aparecer varias semanas después del tratamiento. En el ejemplo se observa la banda de 40

## Resultados

KDa muy débilmente, desapareciendo al final del experimento y también las bandas de 55 (que casi no se aprecia), 70, 80-90, 105 y 125 KDa.



**Figura 25:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75. Lote 3: anfotericina B dimérica formulada en HSA; Lote 4: anfotericina B poliagregada formulada en HSA; Lote 5: anfotericina B monomérica formulada en HSA.

En el lote tratado con la anfotericina B dimérica formulada en HSA predominan las bandas de entre 80-115 KDa, con pocas bandas por encima y debajo de ese rango. En el animal del ejemplo aparecen bandas de 55, que se hace muy débil, 80-

90, 105, 115 y 125 kDa. En el lote tratado con la formulación de anfotericina B poliagregada formulada en HSA encontramos patrones de reconocimiento antigénico de entre 16 y 125 KDa, con predominio de bandas de entre 50 y 100 KDa. En la figura se observan bandas de 30 y 32 KDa, solo al final del experimento, 55 (que se hace más débil con el tiempo), 70, 80-90, 115 y 125 KDa. En el lote tratado con la formulación de anfotericina B monomérica formulada en HSA encontramos bandas de 30 KDa, que desaparece al final del experimento, 55, que se hace más débil después del tratamiento, 70, que desaparece, 80-90, 105 y 115 KDa.

**Tabla 25:** Porcentaje de la subpoblación linfocitaria CD4+ en bazo, el día del sacrificio (145 p.i.). También se determinó en los controles de cricetos sanos.

Citometría de flujo			Citometría de flujo (cont.)		
Lote	Animal	% CD4+	Lote	Animal	% CD4+
Control infección	1	5.19	Anfo B poliagregada HSA	1	8.39
	2	14.52		2	16.30
	3	5.49		3	8.50
	4	5.34		4	4.46
	5	7.46		5	11.63
	Media	7.60		Media	9.85
	DS	3.97		DS	4.40
Anfo B dimérica libre	-	-	Anfo B monomérica HSA	1	16.72
	2	8.19		2	14.81
	3	4.98		3	21.59
	4	5.36		4	20.58
	5	9.44		5	18.87
	Media	6.99		Media	18.51*
	DS	2.17		DS	2.77
Anfo B dimérica HSA	3	6.10	Control sano	1	9.38
	4	7.39		2	5.27
	5	6.44		3	7.28
	Media	6.64		Media	7.31
	DS	0.66		DS	1.67

Aquí, encontramos bajos porcentajes de CD4+ en todos los lotes incluido el de los animales sanos, por lo que pudiera ser que el anticuerpo monoclonal no hubiera funcionado correctamente (hay que recordar que no es un monoclonal específico de criceto), sin embargo, esto no nos impide establecer una comparación, ya que estamos realizando una cuantificación relativa. Si nos fijamos en los valores medios de cada lote observamos que no se ha producido variación en la subpoblación CD4+ con respecto al grupo de los controles sanos. En el lote control de infección no existe correlación con la carga parasitaria, pero el animal con más porcentaje de células

## **Resultados**

CD4+ es el que tiene más niveles de anticuerpos. En los dos lotes tratados con la anfotericina B dimérica no se producen cambios en dicha subpoblación con respecto al control de infección, pero hay que tener en cuenta que en este caso hemos realizado el tratamiento en el periodo sintomático de la enfermedad y no en la fase temprana como en el experimento anterior, en el que si se apreciaban cambios. Tampoco existe correlación con la carga parasitaria en estos casos, pero los dos animales tratados con la anfotericina B dimérica libre que presentan mayor porcentaje de células CD4+, son los que tienen mayores niveles de anticuerpos. Si seguimos teniendo en cuenta los valores medios, en el lote tratado con la anfotericina B poliagregada formulada en HSA, se produce un ligero aumento de la subpoblación CD4+ con respecto al control de infección, concretamente son los animales 2 y 5 los que más porcentaje presentan, pero no encontramos correlación con la carga parasitaria. Curiosamente, en el lote tratado con la anfotericina B monomérica formulada en HSA, es en el que se produce un mayor aumento de dicha subpoblación (\*  $p < 0.05$ ) a pesar de ser el que presenta menor eficacia parasitológica, no existiendo correlación con la carga parasitaria o con los anticuerpos

**Tabla 26:** Índices de estimulación correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro* frente a mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y antígenos (LEM75 y BCN150) en bazo, el día 145 p.i. Se consideró que había existido proliferación cuando  $IE \geq 2$ .

Lote	Animal	Índices de estimulación (IE)			
		Mitógenos		Antígenos	
		Con A	Fit.	LEM75	BCN150
Control infección	1	0.85	0.96	0.89	1.23
	2	0.74	0.77	0.51	0.31
	3	0.58	0.66	1.05	0.34
	4	1.16	0.61	0.65	0.58
	5	0.89	1.09	1.01	1.34
	<b>Media</b>	<b>0.84</b>	<b>0.82</b>	<b>0.83</b>	<b>0.76</b>
	<b>DS</b>	<b>0.21</b>	<b>0.20</b>	<b>0.23</b>	<b>0.49</b>
Anfo B dímera libre	2	1.18	0.94	0.56	1.18
	3	0.50	0.34	0.50	0.32
	4	1.40	0.81	1.25	0.40
	5	2.66	1.25	0.60	-
	<b>Media</b>	<b>1.43</b>	<b>0.84</b>	<b>0.73</b>	<b>0.64</b>
	<b>DS</b>	<b>0.77</b>	<b>0.37</b>	<b>0.35</b>	<b>0.47</b>
Anfo B dímera HSA	3	3.61	0.93	1.35	2.86
	4	1.67	0.43	0.40	0.16
	5	0.41	0.16	0.52	0.25
	<b>Media</b>	<b>2.10</b>	<b>0.50</b>	<b>0.76</b>	<b>1.09</b>
	<b>DS</b>	<b>1.34</b>	<b>0.39</b>	<b>0.52</b>	<b>1.53</b>
Anfo B poliagregada HSA	1	2.86	0.86	0.53	1.20
	2	0.83	1.30	0.67	1.04
	3	2.78	0.92	1.84	0.27
	4	6.59	0.99	0.80	0.93
	5	0.45	0.43	0.32	0.51
	<b>Media</b>	<b>2.70</b>	<b>0.90</b>	<b>0.83</b>	<b>0.79</b>
<b>DS</b>	<b>2.43</b>	<b>0.31</b>	<b>0.59</b>	<b>0.38</b>	
Anfo B monomérica HSA	1	1.05	0.39	0.57	0.76
	2	1.23	0.68	2.00	0.43
	3	1.01	0.36	0.48	0.36
	4	0.51	0.49	0.31	0.42
	5	1.47	1.13	0.98	0.92
	<b>Media</b>	<b>1.05</b>	<b>0.61</b>	<b>0.87</b>	<b>0.58</b>
<b>DS</b>	<b>0.35</b>	<b>0.31</b>	<b>0.68</b>	<b>0.24</b>	
Control sano	1	13.01	2.80	1.71	0.50
	2	21.94	2.72	2.03	0.80
	3	16.07	2.95	1.75	1.30
	<b>Media</b>	<b>17.00</b>	<b>2.82</b>	<b>1.83</b>	<b>0.86</b>
	<b>DS</b>	<b>3.70</b>	<b>0.09</b>	<b>0.14</b>	<b>0.32</b>

En el grupo de los animales sanos, la proliferación celular es mayor frente a concanavalina A que frente a fitohemaglutinina, al igual que en otros experimentos. En todos los lotes infectados con *L. infantum* existe una inhibición de la proliferación celular inespecífica (frente a mitógenos), con respecto al grupo de los animales sanos

## **Resultados**

y frente a los antígenos no existe proliferación celular en ningún caso. Pero en el lote tratado con la formulación de HSA conteniendo anfotericina B poliagregada sí existe mayor proliferación frente a concanavalina A ( $IE \geq 2$ ) con respecto al control de infección, aunque es menor que en los animales sanos. En las células del animal 1 del lote tratado con la formulación de albúmina conteniendo anfotericina B dimérica, en el que no existen parásitos ni en hígado ni en bazo, también existe proliferación celular frente a concanavalina A y frente al antígeno de la cepa BCN150 ( $IE \geq 2$ ). En el caso de los animales tratados con la anfotericina B dimérica libre solo existe proliferación, frente a concanavalina A, en las células del animal 5 del lote. Por último, en el lote tratado con la anfotericina B monomérica encapsulada, no se produce proliferación celular frente a antígenos o mitógenos y hay que recordar que dicha formulación es la menos eficaz de todas.

En resumen, los índices de estimulación frente a concanavalina A, en algunos de los animales tratados, aún no son tan altos como en los animales sanos debido, probablemente, a que en la mayoría de los animales todavía albergan parásitos en sus órganos.

## 4. ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA.

En este punto del desarrollo experimental y a la luz de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores con los distintos estados de agregación de la anfotericina B, nos planteamos realizar ensayos de toxicidad para poder decidir por donde continuar en los ensayos de eficacia e inmunológicos, es decir, queríamos comprobar si, como sospechábamos, el estado de poliagregado era el menos tóxico de los tres.

Para ello, los estudios de toxicidad *in vivo* fueron realizados en dos etapas. En una primera etapa, se investigó la toxicidad aguda en animales sanos. Una vez conocida y tomando como referencia los resultados obtenidos, se investigó la toxicidad aguda en los animales enfermos ya que el desarrollo de la enfermedad puede potenciar la toxicidad aguda del fármaco.

El hecho de estudiar en primer lugar la toxicidad aguda en animales sanos y después en enfermos, es porque trabajar desde el principio con animales enfermos es mucho más laborioso, siendo necesario seguir el desarrollo de la enfermedad para clasificarlos en grupos homogéneos en función del grado de infección. Por eso, a fin de utilizar el menor número de animales enfermos, primero se aproximó la toxicidad en animales sanos.

**4.1. Estudio de la toxicidad aguda en animales sanos:** se ensayaron las siguientes formulaciones:

- Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** formulada en microesferas de HSA.
- Anfotericina B de referencia en estado **dimérico** formulada en microesferas de HSA.
- Anfotericina B de referencia en estado **monomérico** formulada en microesferas de HSA.
- **Fungizona**<sup>®</sup>.
- Anfotericina B de referencia en estado **dimérico** libre.

## Resultados

Para cada preparación, se inyectaron la dosis de 2.5, 5, 10, 15, 20 y 40mg/Kg de anfotericina B hasta igualar o superar la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>), a grupos de 7 cricetos cada uno.

**Tabla 27:** Mortalidad en las 48 horas siguientes a la administración de las dosis en cricetos sanos.

	2.5 mg/Kg	5 mg/Kg	10 mg/Kg	15 mg/Kg	20 mg/Kg	40 mg/Kg
<b>Microesferas de anfotericina B poliagregada</b>	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
<b>Microesferas de anfotericina B dimérica</b>	0 %	0 %	14 % *	29 % *	100 %	-
<b>Microesferas de anfotericina B monomérica</b>	0 %	100 %	-	-	-	-
<b>Fungizona®</b>	0 %	0 %	0 % *	14 % *	100 %	-
<b>Anfotericina B dimérica libre</b>	0 %	0 %	0 % *	0 % *	100 %	-

\* Los animales que sobreviven, tardan varios minutos en recuperar el comportamiento normal después de la inyección.

La formulación de microesferas de albúmina con anfotericina B poliagregada, se dispersó en suero glucosado y se inyectó. Después de haber administrado 40 mg/Kg de principio activo, ninguno de los animales murió ni mostró reacciones adversas significativas. No se probaron cantidades mayores porque no se consiguió una fácil y rápida dispersión completa de las microesferas en el suero glucosado. La formulación de microesferas con anfotericina B dimérica, se dispersó en suero glucosado y se inyectó. Con las dosis de 2.5 y 5 mg/Kg, no se observó ninguna muerte ni sufrimiento aparente en los animales. Al administrar 10 mg/Kg, murió uno de siete animales (el 14%) y los otros seis no recuperaron su comportamiento normal hasta pasados varios minutos después de la inyección. Al incrementar la dosis a 15 mg/Kg murieron dos de siete animales (el 29%) y los restantes tardaron varios minutos en reponerse. Con 20 mg/Kg, la mortalidad fue del 100%. La formulación de microesferas con anfotericina B monomérica, se dispersó en una disolución de 135 mg/ml de  $\gamma$ -ciclodextrina en suero glucosado. Al inyectar la dosis correspondiente a 5 mg/Kg de

anfotericina B murieron todos los animales. Al inyectar Fungizona® a la dosis de 10 mg/Kg y superiores, los animales resultaron afectados y no reestablecieron su actitud y movilidad normales hasta pasados varios minutos. Después de la administración de 15 mg/Kg murió uno de siete animales (el 14%) y con 20 mg/Kg murieron todos. La preparación anfotericina B dimérica sin encapsular tiene una composición cualitativa y cuantitativa igual que Fungizona® y los resultados obtenidos fueron iguales que los observados con la especialidad farmacéutica, con la única diferencia de que no murió ningún animal cuando se administraron 15 mg/Kg.

En resumen, las dosis máximas de anfotericina B que no producen muertes ni modificaciones en la actividad y el comportamiento de los criceto sanos son: la formulación de microesferas con anfotericina B poliagregada: 40 mg/Kg; la formulación de microesferas con anfotericina B dimérica: 5 mg/Kg; la formulación de microesferas con anfotericina B monomérica: 2.5 mg/Kg; la Fungizona®: 5 mg/Kg y la anfotericina B dimérica sin encapsular: 5 mg/Kg.

**4.2. Estudio de la toxicidad aguda en animales enfermos:** Los cricetos fueron infectados por vía intracardíaca con  $10^7$  promastigotes de “reciente aislamiento” de la cepa BCN150 de *L. infantum*. En la séptima semana después de la infección, se tomaron muestras de sangre para determinar el nivel de anticuerpos en suero y, a partir de los datos obtenidos los animales se clasificaron en cinco grupos uniformes. El día 69 p.i. se administraron las mismas preparaciones que se inyectaron a los animales sanos, a las dosis indicadas en la siguiente tabla, la cual incluye también los resultados de mortalidad obtenidos.

## Resultados

**Tabla 28:** Mortalidad en las 48 horas siguientes a la administración de las dosis en cricetos enfermos.

	2.5 mg/Kg	5 mg/Kg	40 mg/Kg
Microesferas de anfotericina B poliagregada	-	-	0 %
Microesferas de anfotericina B dimérica	0 %	100 %	-
Microesferas de anfotericina B monomérica	0 %	-	-
Fungizona®	0 %	100 %	-
Anfotericina B dimérica libre	0 %	100 %	-

Por lo tanto, las dosis máximas de anfotericina B que no han producido alteraciones aparentes en el comportamiento de los cricetos enfermos son: la formulación de microesferas con anfotericina B poliagregada: 40 mg/Kg; la formulación de microesferas con anfotericina B dimérica: 2.5 mg/Kg; la formulación de microesferas con anfotericina B monomérica: 2.5 mg/Kg; en la Fungizona®: 2.5 mg/Kg; la preparación de anfotericina B dimérica libre: 2.5 mg/Kg. Por lo tanto, se demuestra que, al menos en algunas de las formulaciones, la toxicidad aguda es mayor en los animales enfermos que en los sanos.

## **5. TRATAMIENTO EN EL PERIODO SINTOMATICO CON ANFOTERICINA B POLIAGREGADA FORMULADA EN HSA, A LA DOSIS DE 40 mg/Kg/día.**

En base a los resultados obtenidos en los anteriores experimentos decidimos continuar con los siguientes planteamientos:

- Seguir empleando la pauta triple en el periodo sintomático de la enfermedad, porque permite realizar un mejor seguimiento inmunológico, sobre todo humoral.
- Puesto que el estado de agregación poliagregado parecía ser el más prometedor, decidimos incluir un lote con la formulación de albúmina sérica humana a la mayor dosis principio activo que es posible encapsular (40 mg/Kg de peso).
- Aunque ya habíamos visto que la microesferas de albúmina vacías no ejercían ningún efecto *per se* sobre la respuesta inmune y la eficacia, en la fase temprana de la infección, incluimos un lote de animales a los que se les administraron las microesferas vacías en la cantidad correspondiente a 40 mg/Kg/día, ya que al aumentar la dosis del principio activo también aumenta la cantidad de albúmina necesaria para su encapsulación.

El experimento se diseñó de la siguiente manera: se infectaron un total de 20 cricetos machos, con  $10^7$  promastigotes de “reciente aislamiento” de la cepa BCN 150 de *L. infantum*, por vía intracardiaca. Previo al tratamiento, se constituyeron lotes homogéneos de 6 animales (excepto en el lote de las microesferas vacías, en el que se emplearon sólo 3 animales), en función del aspecto externo, de los síntomas y de los niveles de anticuerpos. Los animales sobrantes se emplearon para otros fines. El tratamiento se realizó en tres días alternos: **69, 71 y 73 p.i.**, por vía intracardiaca. El sacrificio se llevó a cabo los días **145-146 p.i.**

Los lotes fueron los siguientes:

## Resultados

**Lote 1:** Control de infección.

**Lote 2:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** a la dosis de 40 mg/Kg peso/día, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 3:** Microesferas de HSA vacías. Este lote solo constaba de 3 animales.

A lo largo del experimento se murió el animal 6 del lote 1 en el momento de la infección.

**Tabla 29:** Pesos de los animales en gramos a lo largo del experimento, se incluyó un lote de controles sanos, es decir, no infectados con el parásito.

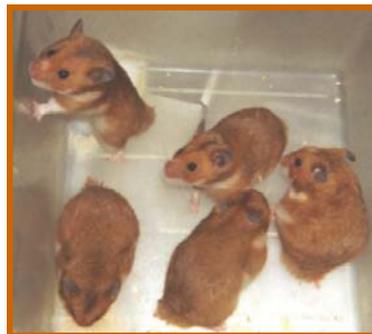
		Pesos de los animales a lo largo del experimento								
		Semana p.i.								
Lote	Ani.	1 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
Control infección	1	72	71	104.8	111.1	113	112	127	123	103
	2	67	83	92.60	99.70	98	97	87	75	67
	3	81	125.6	130	105	105	106	116.5	114	115
	4	72	88	100	134.6	135	137	145	142	136
	5	66	84	98.60	104	107	108	121.4	120	115
	<b>Media</b>	<b>71.60</b>	<b>90.32</b>	<b>105.2*</b>	<b>111.5</b>	<b>111.6</b>	<b>112*</b>	<b>119.5*</b>	<b>114.8*</b>	<b>107.2*</b>
	<b>DS</b>	<b>5.31</b>	<b>18.53</b>	<b>12.99</b>	<b>12.28</b>	<b>12.64</b>	<b>13.43</b>	<b>19.11</b>	<b>21.99</b>	<b>22.73</b>
Anfo B poliagregada 40 mg HSA	1	73	102.5	108.5	102	105	113	122	123	130
	2	83	81	112	103	109	115	119	118	120
	3	71	81	92	88.10	96	97	103	103	111
	4	82	93	107	104	109	114	120	122	127
	5	80	103	120	112	121	126	134	137	140
	6	83	112	135	125	132	139	152	152	155
	<b>Media</b>	<b>78.66</b>	<b>95.41</b>	<b>112.4</b>	<b>105.6</b>	<b>112</b>	<b>117.3</b>	<b>125</b>	<b>125.8*</b>	<b>130.5*</b>
<b>DS</b>	<b>4.85</b>	<b>11.57</b>	<b>13.09</b>	<b>11.14</b>	<b>11.57</b>	<b>12.86</b>	<b>15.07</b>	<b>15.35</b>	<b>14.10</b>	
HSA vacías	1	66	85	94	96	97	105	118	115	111
	2	81	102	117	116	113	120	126	128	127
	3	75	63	95	90	97	104	101	98	73
	<b>Media</b>	<b>74</b>	<b>83.30*</b>	<b>102*</b>	<b>100,7</b>	<b>102,3</b>	<b>109,7*</b>	<b>115*</b>	<b>113,7*</b>	<b>103,7*</b>
<b>DS</b>	<b>7,50</b>	<b>19,60</b>	<b>13</b>	<b>13,60</b>	<b>9,20</b>	<b>9</b>	<b>12,80</b>	<b>15</b>	<b>27,70</b>	
Control sano	1	73	115	120	-	-	128.6	130	151	137
	2	70	98.40	109	-	-	111.7	119	124	136
	3	75	106	117	-	-	123.5	132	135	143
	4	74	103	115	-	-	117	128	132	139
	5	76	108	117	-	-	122	130	135	138
	<b>Media</b>	<b>73,60</b>	<b>106,1</b>	<b>115,6</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>120,6</b>	<b>127,8</b>	<b>135,4</b>	<b>138,6</b>
<b>DS</b>	<b>2,30</b>	<b>6,20</b>	<b>4,10</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>6,50</b>	<b>5,10</b>	<b>9,80</b>	<b>2,70</b>	

En el lote control de infección los pesos, que son menores que los de los animales sanos (\*  $p < 0.05$ ), aumentan hasta la semana 16<sup>a</sup>, para después decaer en la última semana. En el lote tratado con las microesferas vacías, los pesos también son

menores a los de los animales sanos (\*  $p < 0.05$ ), y descienden a partir de la semana 16ª p.i. En el lote tratado con la anfotericina B poliagregada formulada en HSA, el peso de los animales va aumentando progresivamente a lo largo del experimento, llegando a alcanzar valores más altos que en los otros dos lotes infectados, pero algo menores aún que en el grupo sano (\*  $p < 0.05$ ).



***Criceto del lote control de infección, con menor peso, mal aspecto externo y pérdida de movilidad en las extremidades.***



***Cricetos del lote tratado con la anfotericina B poliagregada a la dosis de 40 mg/Kg/día, encapsulada en HSA; con peso normal, buen aspecto y buena movilidad.***

## Resultados

**Tabla 30:** Pesos de los órganos (bazo e hígado) en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, en el día del sacrificio.

Lote	Ani.	Peso órganos		Amastigotes/mg órgano (x 10 <sup>6</sup> )	
		Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
Control infección	1	0.93	6.18	314.5	198.38
	2	0.58	4.48	28.08	52.42
	3	1.13	8.07	17.87	0.699
	4	1.24	9.86	65.53	1.638
	5	0.66	6.80	0.341	0.215
	Media	<b>0.91 *</b>	<b>7.07 *</b>	<b>85.26</b>	<b>50.67</b>
DS	<b>0.25</b>	<b>1.80</b>	<b>116.58</b>	<b>76.5</b>	
Anfo B poliagregada 40 mg HSA	1	0.34	6.48	0	0
	2	0.50	7.45	0	0.000700
	3	0.30	5.99	0	0
	4	0.27	7.02	0	0.000777
	5	0.29	7.46	0	0
	6	0.36	9.13	0	0.000298
Media	<b>0.34 *</b>	<b>7.25 *</b>	<b>0 *</b>	<b>0.000295 *</b>	
DS	<b>0.07</b>	<b>0.98</b>	<b>0</b>	<b>0.000331</b>	
HSA vacías	1	0.87	6.81	19.66	50.36
	2	0.85	9.14	78.64	43.95
	3	0.93	6.33	262.144	46.16
	Media	<b>0.88 *</b>	<b>7.42 *</b>	<b>120.148</b>	<b>46.82</b>
DS	<b>0.03</b>	<b>1.22</b>	<b>103.25</b>	<b>2.65</b>	
Control sano	1	0.09	5.63	-	-
	2	0.13	6.20	-	-
	3	0.10	5.67	-	-
	Media	<b>0.10</b>	<b>5.83</b>	-	-
DS	<b>0.02</b>	<b>0.26</b>	-	-	

En todos los lotes existe un aumento del tamaño de los órganos respecto a los controles sanos (\*  $p < 0.05$ ), sin embargo, la esplenomegalia es mucho menos marcada en el lote tratado con la formulación de anfotericina B poliagregada en HSA. En ese lote, el tamaño del hígado es similar al de los otros grupos infectados. Además, en todos los demás animales infectados los órganos presentaban un aspecto necrosado, punteado y blanquecino, mientras que en el lote tratado con la anfotericina B poliagregada encapsulada todos los bazos presentaban buen aspecto y los hígados mostraban el color rojo vino característico de los animales sanos.

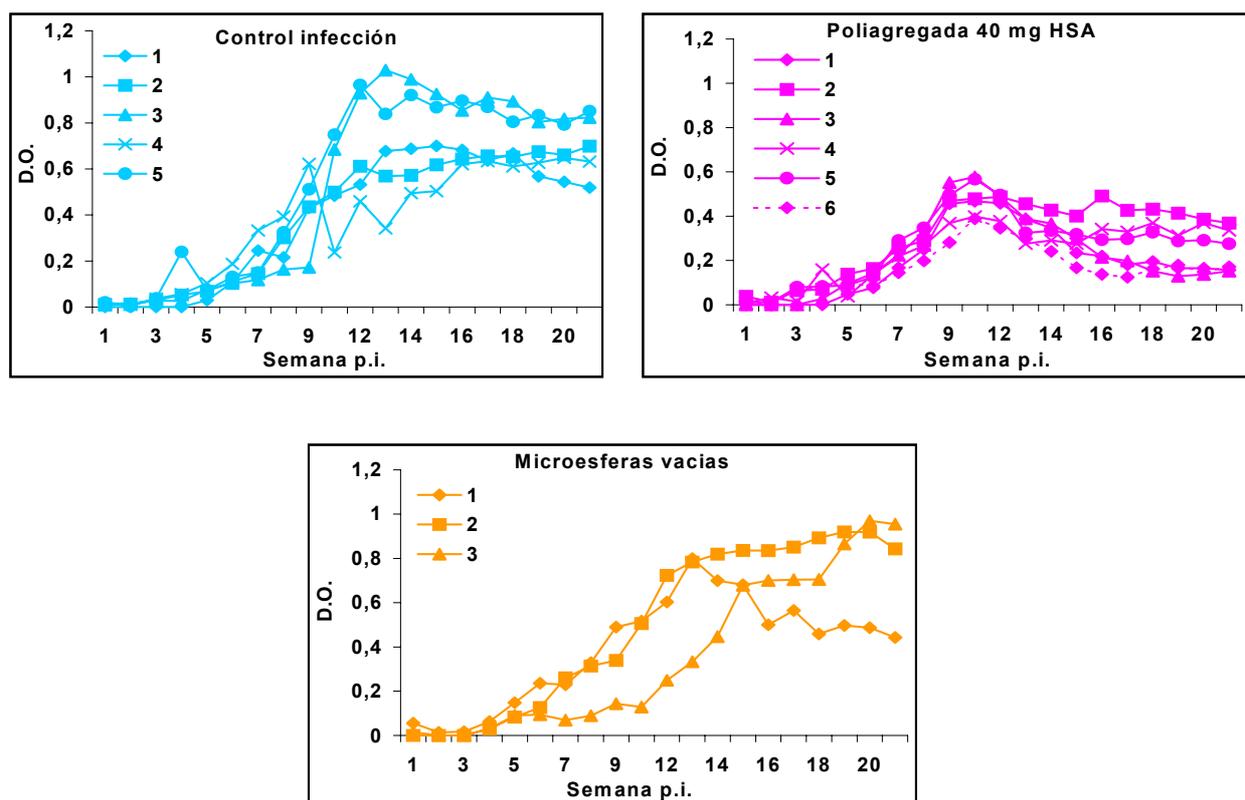
En el lote tratado con la anfotericina B poliagregada formulada en HSA, se consigue la eliminación completa de los parásitos del bazo de todos los animales y del hígado de 3 de ellos; es decir, se consigue un efecto homogéneo y contundente en cuanto a la reducción de la carga parasitaria (\*  $p < 0.01$ ), con cura parasitológica de la

mitad del lote. En el lote tratado con las microesferas vacías no se observa variación de la carga parasitaria con respecto al control de infección.

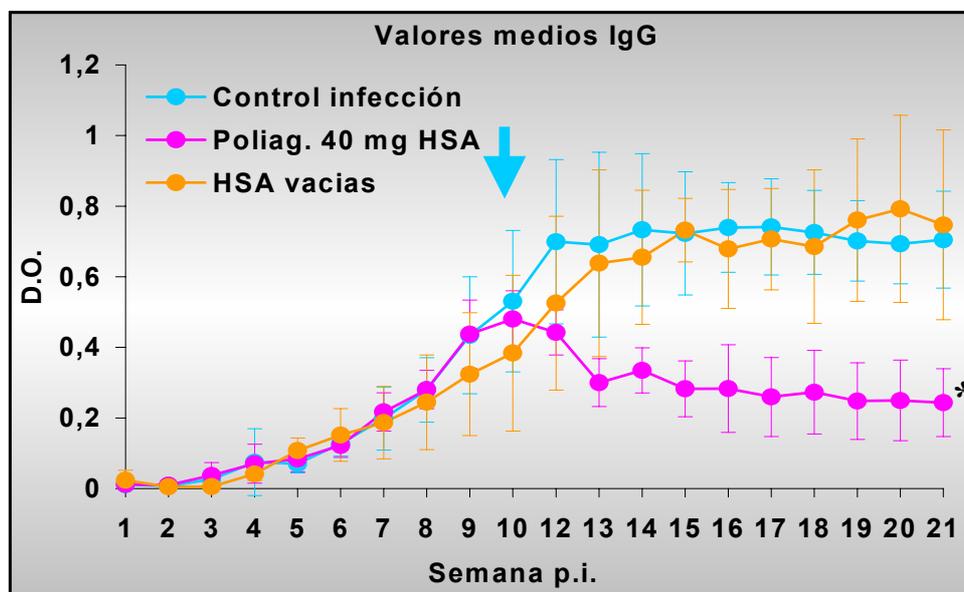
**Tabla 31:** Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de todos los lotes respecto al control de infección, tanto en bazo como en hígado.

% REDUCCION DE LA CARGA PARASITARIA RESPECTO AL CONTROL INFECCION		
	Bazo	Hígado
Poliagregada 40 mg HSA	100 *	99.99 *
HSA vacias	-	7.63

\*  $p < 0.05$

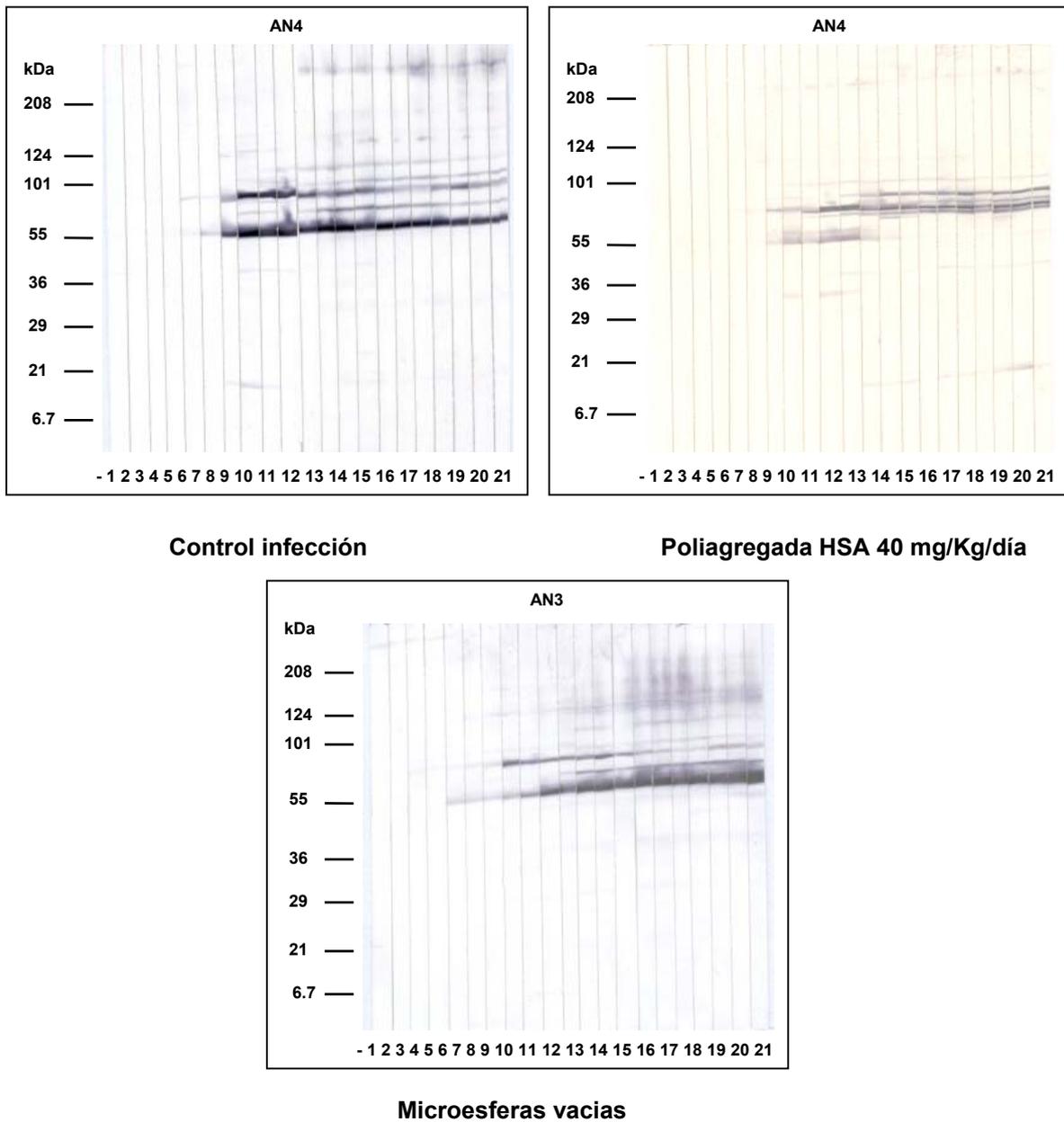


**Figura 26:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. Lote 1: control de infección; Lote 2: anfotericina B poliagregada 40 mg formulada en HSA; Lote 3: microesferas de HSA vacias.



**Figura 27:** Niveles medios de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. La flecha indica la semana del tratamiento.

Los valores medios muestran que los lotes control de infección y tratado con microesferas vacias, presentan niveles de IgG similares. En el lote tratado con la formulación de anfotericina B poliagregada encapsulada es donde se observa un claro descenso de los niveles de IgG después del tratamiento (\*  $p < 0.01$ ), lo que concuerda con la alta eficacia farmacológica encontrada en estos animales. Además, la ventaja que presenta la preparación poliagregada es que se ha conseguido encapsular una dosis de anfotericina B muchísimo más alta, lo que contribuye a aumentar la eficacia con ausencia de efectos tóxicos.



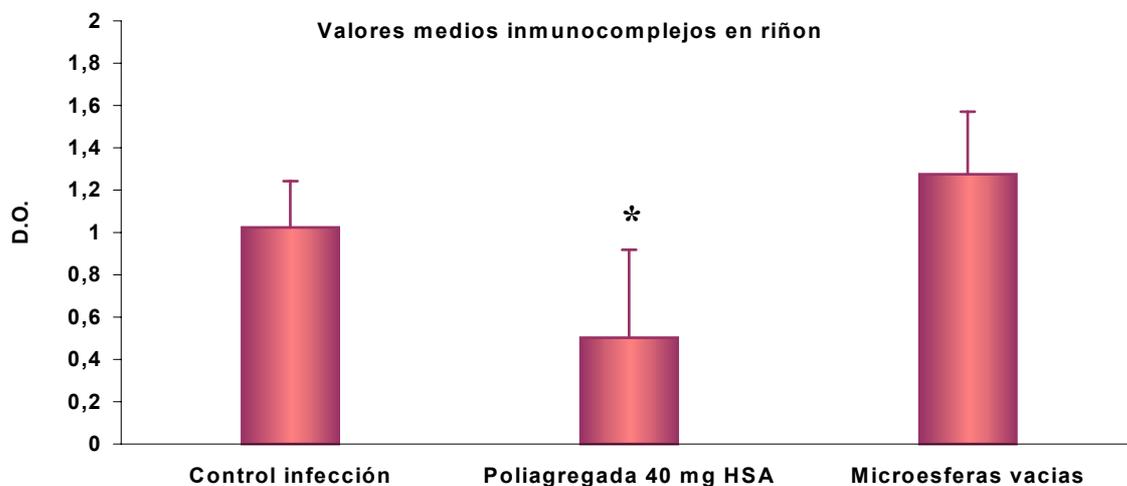
**Figura 28:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75. Lote 1: control de infección; Lote 2: anfotericina B poliagregada 40 mg formulada en HSA; Lote 3: microesferas de HSA vacías.

## Resultados

En el lote control de infección encontramos bandas de entre 30 y 150 KDa, aunque en la mayoría de los animales la mayoría de las bandas se encuentran entre 30 y 125 KDa, tal y como habíamos visto en el experimento anterior. En el lote tratado con la anfotericina B poliagregada a la dosis de 40 mg/Kg/día, encontramos las bandas de 16-18, 40, que desaparece, 42, 55, que desaparece, 70, 80-90, 105 y 115 KDa, siendo lo más destacado la desaparición de la banda de 55 KDa después del tratamiento. Por último, en el lote tratado con las microesferas vacías el patrón está formado por bandas de 40 (muy débil), 55, 60, 70, 80-90, 105 y 125 KDa.

### Determinación de inmunocomplejos en riñón.

Dada la alta eficacia encontrada en el lote tratado con la dosis de 40 mg/Kg/día de anfotericina B encapsulada, en este experimento decidimos realizar la determinación de los inmunocomplejos en riñón, para ver si existía correlación entre ambos parámetros.



**Figura 29:** Valores medios de los inmunocomplejos en el día del sacrificio, expresados en densidades ópticas. **D.O.:** D.O. p-D.O. n.

Se produce un descenso de inmunocomplejos notable en el lote tratado con la forma poliagregada formulada a la dosis de 40 mg/Kg/día (\*  $p < 0.05$ ). Por lo tanto, existe una correlación directa entre los niveles de inmunocomplejos en riñón y la reducción de la carga parasitaria.

**Tabla 32:** Porcentaje de la subpoblación linfocitaria CD4+ en bazo, en el día del sacrificio (145 p.i.). También se determinaron en un grupo de cricetos sanos.

Citometría de flujo		
Lote	Animal	% CD4+
Control infección	1	12,58
	2	23,08
	3	18,45
	4	30,06
	5	15,28
	Media	19,89
	DS	6,89
Anfo B poliagregada 40 mg HSA	1	8,32
	2	4,89
	3	5,64
	4	7,22
	5	6,84
	6	7,13
	Media	6,67 *
DS	1,22	
HSA vacias	1	7,87
	2	23,47
	3	29,86
	Media	20,40
DS	11,31	
Control sano	1	24,28
	2	17,77
	3	22,10
	Media	21,38
DS	2,70	

Lo más sorprendente de todo es la disminución de esta subpoblación en todos los animales del lote tratado con la anfotericina B poliagregada encapsulada a la dosis de 40 mg/Kg/día (\*  $p < 0.05$ ), lo que se correlaciona con la menor carga parasitaria. En el lote tratado con las microesferas vacias no se aprecian diferencias con el lote control de infección y los animales con mayor porcentaje de CD4+ son los que presentan mayor carga en bazo, mientras que el que tiene menor porcentaje presenta menores niveles de anticuerpos.

## Resultados

**Tabla 33:** Índices de estimulación correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro* frente a mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y el antígeno de la cepa LEM75 en bazo, el día 145 p.i. Se consideró que había existido proliferación cuando  $IE \geq 2$ .

Lote	Animal	Índices de estimulación (IE)		
		Mitógenos		Antígeno
		Con A	Fitoh.	LEM75
Control infección	1	1.14	0.17	0.51
	2	2.21	0.48	0.29
	3	1.55	0.21	0.99
	4	1.79	0.46	0.77
	5	1.81	2.52	1.3
	<b>Media</b>	<b>1.70</b>	<b>0.77</b>	<b>0.77</b>
	<b>DS</b>	<b>0.39</b>	<b>0.98</b>	<b>0.39</b>
Anfo B poliagregada 40 mg HSA	1	5.7	1.82	2.86
	2	3.02	1.38	2.93
	3	5.5	2.84	2.66
	4	4.5	1.34	2.78
	5	10.37	2.75	0.68
	6	5.77	2.77	1.81
	<b>Media</b>	<b>5.8</b>	<b>2.15</b>	<b>2.28</b>
<b>DS</b>	<b>2.46</b>	<b>0.65</b>	<b>0.80</b>	
HAS vacías	1	0.44	0.24	1.13
	2	1.80	0.81	0.43
	3	0.80	0.84	0.62
	<b>Media</b>	<b>1.01</b>	<b>0.63</b>	<b>0.73</b>
	<b>DS</b>	<b>0.57</b>	<b>0.27</b>	<b>0.29</b>
Control sano	1	30.92	4.5	0.78
	2	22.04	3.00	0.99
	3	25.39	2.57	1.52
	<b>Media</b>	<b>26.11</b>	<b>3.35</b>	<b>1.09</b>
	<b>DS</b>	<b>3.66</b>	<b>0.82</b>	<b>0.31</b>

En el caso de los mitógenos, como siempre, las células proliferan más frente a concanavalina A que frente a fitohemaglutinina en el lote de los animales sanos.

En el lote tratado con la anfotericina B poliagregada formulada en albúmina, a la dosis de 40 mg/Kg/día, existe una recuperación de la proliferación celular frente a concanavalina A en las células de todos los animales con respecto al grupo control de infección, coincidiendo con su curación parasitológica; pero aún no existe tanta proliferación como en el lote de los animales sanos. Probablemente haya que esperar más tiempo para observar una recuperación total.

Frente a fitohemaglutinina de entre los lotes infectados, las células en las que existe menos inhibición de la proliferación celular son las del lote tratado con la anfotericina B poliagregada formulada en HSA, existiendo  $IE \geq 2$  en tres de los animales del lote. En la mayoría de los animales infectados existe ausencia de proliferación celular antígeno-específica, pero en 4 de los animales tratados con anfotericina B poliagregada el IE es  $\geq 2$ .

## **6. TRATAMIENTO EN EL PERIODO SINTOMATICO CON ANFOTERICINA B POLIAGREGADA LIBRE Y FORMULADA EN HSA, A LAS DOSIS DE 10 y 20 mg/Kg/día.**

Dado que la anfotericina B de referencia formulada en HSA era muy eficaz a una dosis muy alta (40 mg/Kg/día), decidimos probar su eficacia a dosis intermedias entre la de 2 y 40 mg/Kg/día. Se eligieron las dosis de 10 y 20 mg/Kg peso/día, tanto encapsuladas como libres, a fin de determinar también el grado de toxicidad.

El experimento se diseñó de la siguiente manera: se infectaron un total de 35 cricetos machos, con  $10^7$  promastigotes de “reciente aislamiento” de la cepa BCN150 de *L. infantum*, por vía intracardiaca. Antes del tratamiento, se formaron grupos homogéneos de 5-6 animales, según los síntomas externos y los niveles de anticuerpos. Los animales sobrantes se emplearon para otros fines. El tratamiento se realizó, como siempre, los días **69, 71 y 73 p.i.**, por vía intracardiaca y el sacrificio tuvo lugar los días **145 y 146 p.i.**

Los lotes de este experimento fueron los siguientes:

**Lote 1:** Control de infección.

**Lote 2:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** a la dosis de 10 mg/Kg peso/día.

**Lote 3:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** a la dosis de 10 mg/Kg peso/día, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 4:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** a la dosis de 20 mg/Kg peso/día.

**Lote 5:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** a la dosis de 20 mg/Kg peso/día, formulada en microesferas de HSA.

A lo largo del experimento se murió el animal 4 del lote 1, durante el proceso de infección y los animales 3 de lote 2 y 1 y 3 del lote 4, durante la semana del tratamiento.

**Resultados**

**Tabla 34:** Pesos de los animales en gramos a lo largo del experimento, se incluyó un lote de controles sanos, es decir, no infectados con el parásito.

Pesos de los animales a lo largo del experimento												
Semana p.i.												
Lote	Ani.	Pre.	4 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
Control infección	1	89.3	101	106	109	113.6	115.8	122	127.3	114	101	94
	2	82	94.5	102	104	111.7	110	113	114	110	105	100.6
	3	78	89	93	93.6	98	99	96	93.7	79	81	77.4
	5	90	105	111	106	104.9	94.4	81	69	59	59	60.1
	6	88	105.8	111.3	115	119.5	118	117	115.6	104	92	91.24
	Media	85,4	99,1	104,6	105,5	109,5	107,4*	105,8*	103,9*	93,2*	87,6*	84,6*
DS	5,2	7,2	7,5	7,8	8,3	10,3	16,9	22,9	23,4	18,4	16,1	
10 mg libre	1	96	105.7	115	116	120.7	123	124	131	133	131	133
	2	93	104.8	110	115	118.3	118.8	126	134.4	135	135	135
	4	89	101.8	105.8	108	113.8	109	112	115	118	115	115.7
	5	99	113.3	118	117	120	120	122	127.5	129	127	130.5
	6	88	101.2	107	107	112.8	116	115	121.9	122	120	120.9
	Media	93	105.4	111.2	112.6	117.1	117.4	119.8	126	127.4	125.6	127
DS	4.1	4.3	4.6	4.2	3.2	5.3	6	7.7	7.2	8.1	8.3	
10 mg HSA	1	90	97.7	105.5	112	116.5	115	-	120.3	122	123	124.4
	2	87	97.7	105.7	107	113.4	113.9	120	118.2	122	122	123.2
	3	86	102.9	107	114	118	116	119	124	127	127	125.8
	4	100	114.1	120.7	123	128.6	128	131	135.9	139	140	137.9
	5	91	101	104.6	110	117.2	116.5	118	123.1	126	126	125.4
	6	87	98.6	103	107	112.3	116	122.8	125.5	127	121	117.2
Media	90,2	102	107,8	112,2	117,7	117,6	122,2	124,5	127,2	126,5	125,7	
DS	5,2	6,3	6,5	6	5,8	5,2	5,3	6,2	6,2	7	6,8	
20 mg libre	2	98.1	108	110	116	116	114.3	118	122	127	125	124.2
	4	88.5	103.9	107.8	112.7	118	116.4	125	129.2	132	130	131.5
	5	73.6	82.2	86	90	91.2	88	94	100	103	100	101.6
	Media	86.7	98.1	101.2	106.2	108.4	106.2	112.3	117.1	120.7	118.3	119.1
DS	10.1	11.3	10.8	11.5	12.1	15.8	16.3	15.2	15.5	16.1	15.6	
20 mg HSA	1	95.6	107.7	114.8	116	122	120	126	127.2	129	129	134
	2	91	103.6	106.4	109.5	112	111.6	116.7	120.9	121	122	123
	3	101	89	94.3	93	101	97	100	101.5	104	107	104.5
	4	81	120.2	129.2	128	135	136.5	140	145.6	148	149	149.4
	5	84	95.8	100	101	107	104.4	110	113	117	115	115.7
	6	103	117.8	125	125	129	124	132.3	137	143	142	139.7
Media	92,6	105,7	111,6	112,1	117,7	115,6	120,8	124,2	127,0	127,3	127,7	
DS	8,9	12,2	13,9	13,6	13,2	14,2	14,8	16,0	16,5	16,0	16,5	
Control sano	1	95	107	108	114	-	121	120	124	127	125	123.8
	2	83	96	97.2	102	-	105	106	108.3	112	111	109.8
	3	88	101	103.4	108	-	113	115	120	123	123	120.6
	Media	88,7	101,3	102,9	108	-	113	113,7	117,4	120,7	119,7	118,1
DS	6	5,5	5,4	6	-	8	7,1	8,2	7,8	7,6	7,3	

En el lote control de infección, el valor medio de los pesos muestra un aumento hasta la semana 12<sup>a</sup> p.i., momento en el cual el peso de los animales comienza a disminuir con respecto al grupo de los animales sanos (\* p< 0.05), con un valor medio al final del experimento de 84,67 gramos. En los lotes tratados con la anfotericina B a la

dosis de 10 mg/Kg/día libre o encapsulada, dosis de 20 mg/Kg/día encapsulada y en el grupo de los animales sanos el peso aumenta progresivamente a lo largo del experimento con valores medios de 127, 125.7, 127.7 y 118.1 gramos respectivamente en la última semana. En el lote tratado con la anfotericina B poliagregada libre a la dosis de 20 mg/Kg/día el peso de los animales aumenta hasta la semana 18<sup>a</sup> p.i. y luego se mantiene con un valor medio de 119.1 gramos en la última semana.

**Resultados**

**Tabla 35:** Pesos de los órganos (bazo e hígado) en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite en el día del sacrificio.

Lote	Animal	Pesos órganos		Amastigotes/mg órgano (x 10 <sup>6</sup> )	
		Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
Control infección	1	0.77	6.28	1.048	0.204
	2	0.58	5.72	0.242	180.13
	3	0.41	5.36	0.296	0.198
	5	0.38	4.51	715.5	10.38
	6	0.79	6.33	0.262	82.03
	<b>Media</b>	<b>0.58 *</b>	<b>5.64</b>	<b>143.46</b>	<b>54.58</b>
	<b>DS</b>	<b>0.17</b>	<b>0.67</b>	<b>286.015</b>	<b>69.83</b>
10 mg libre	1	0.57	7.77	0.00409	0.000329
	2	0.36	6.92	0.000016	0.000152
	4	0.42	5.79	0.000034	0.000178
	5	0.30	7.37	0.0000026	0.0000093
	6	0.17	5.60	0.000000375	0
	<b>Media</b>	<b>0.36 *</b>	<b>6.69 *</b>	<b>0.000828 *</b>	<b>0.000133 *</b>
	<b>DS</b>	<b>0.13</b>	<b>0.85</b>	<b>0.00163</b>	<b>0.000121</b>
10 mg HSA	1	0.41	7.10	0.001024	0.0047
	2	0.54	6.68	0.00028	0.00016
	3	0.42	6.84	0.0000384	0.000568
	4	0.46	8.91	0.0000698	0.000284
	5	0.50	6.69	0.000614	0.00104
	6	0.70	5.68	0.00409	0.000622
	<b>Media</b>	<b>0.50 *</b>	<b>6.98 *</b>	<b>0.00102 *</b>	<b>0.001229 *</b>
<b>DS</b>	<b>0.09</b>	<b>0.96</b>	<b>0.00141</b>	<b>0.00157</b>	
20 mg libre	2	0.31	6.04	0.000085	0.000039
	4	0.24	6.70	0.0000106	0.000157
	5	0.49	4.99	0.0098	0.000174
	<b>Media</b>	<b>0.34 *</b>	<b>5.91</b>	<b>0.00329 *</b>	<b>0.000123 *</b>
<b>DS</b>	<b>0.10</b>	<b>0.70</b>	<b>0.00459</b>	<b>0.00006</b>	
20 mg HSA	1	0.72	6.5	0.00409	0.00209
	2	0.15	6.79	0	0.00000119
	3	0.41	4.54	0.00017	0.00032
	4	0.35	9.10	0.000012	0.0000027
	5	0.31	6.64	0.000000666	0.000167
	6	0.38	7.75	0.000006	0.0000217
	<b>Media</b>	<b>0.38 *</b>	<b>6.88 *</b>	<b>0.000713 *</b>	<b>0.000433 *</b>
<b>DS</b>	<b>0.17</b>	<b>1.37</b>	<b>0.00151</b>	<b>0.000749</b>	
Control sano	1	0.10	6.33	-	-
	2	0.09	5.62	-	-
	3	0.08	5.60	-	-
	<b>Media</b>	<b>0.09</b>	<b>5.85</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
	<b>DS</b>	<b>0.008</b>	<b>0.33</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

En todos los lotes infectados existe una marcada esplenomegalia con respecto al grupo de los animales sanos (\* p< 0.05). Sin embargo, la esplenomegalia es menor en todos los lotes tratados con anfotericina B, siendo, de entre ellos, el lote tratado con la anfotericina B poliagregada encapsulada a la dosis de 10 mg/Kg/día el que presenta bazos de mayor peso. En cuanto al hígado, existe aumento de peso en los lotes

tratados con la anfotericina B poliagregada a la dosis de 10 mg/Kg/día libre, encapsulada y a la dosis de 20 mg/Kg/día encapsulada (\*  $p < 0.05$ ). En la mayoría de los órganos el aspecto era mejor que en el lote control de infección, aunque en el tratado con la dosis de 20 mg/Kg/día libre, el aspecto era necrosado y blanquecino, probablemente debido a su mayor toxicidad.

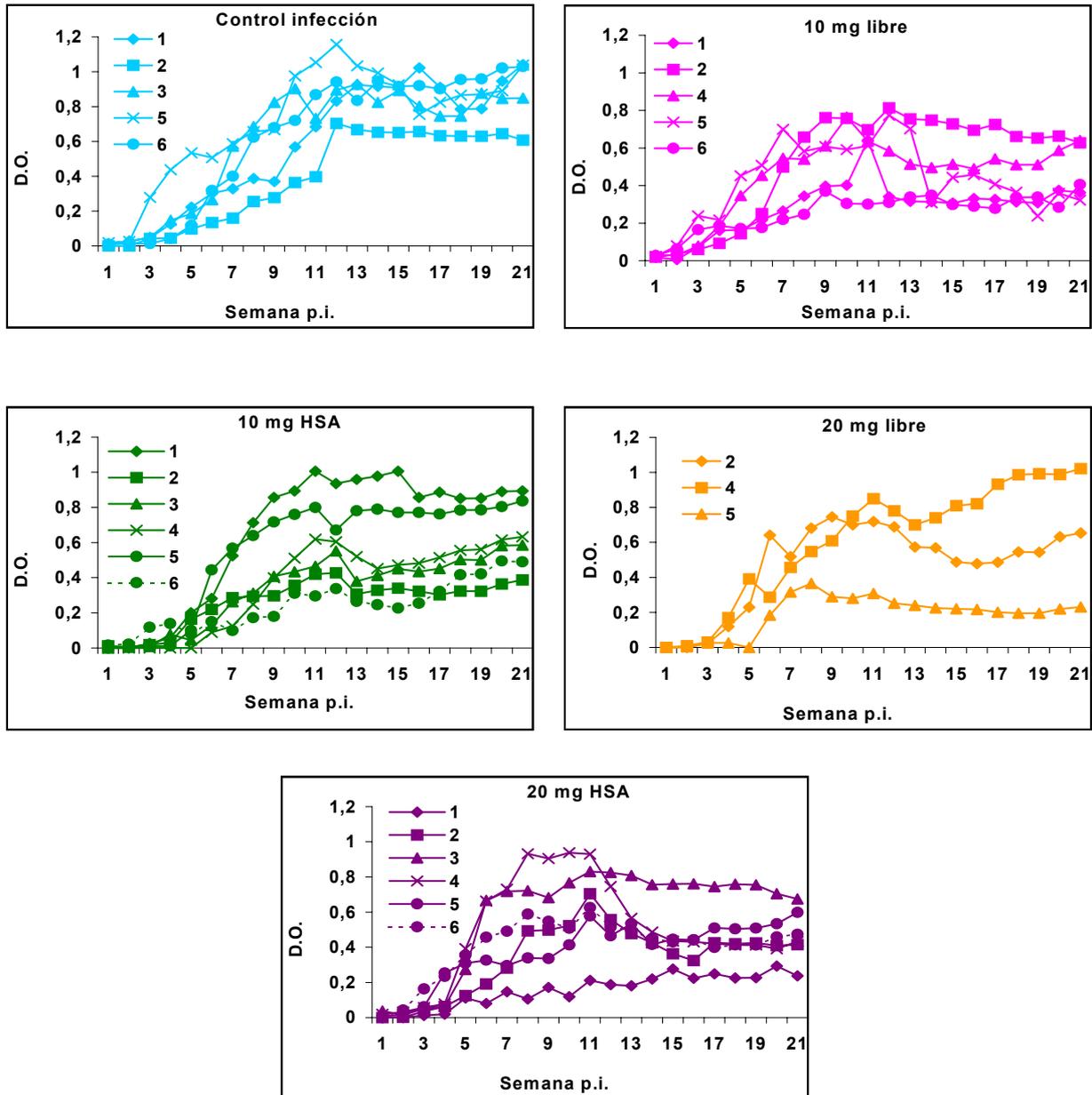
**Tabla 36:** Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de todos los lotes respecto al control de infección, tanto en bazo como en hígado.

	% REDUCCION DE LA CARGA PARASITARIA RESPECTO AL CONTROL INFECCION	
	Bazo	Hígado
10 mg libre	99 *	99 *
10 mg HSA	99 *	99 *
20 mg libre	99 *	99 *
20 mg HSA	99 *	99 *

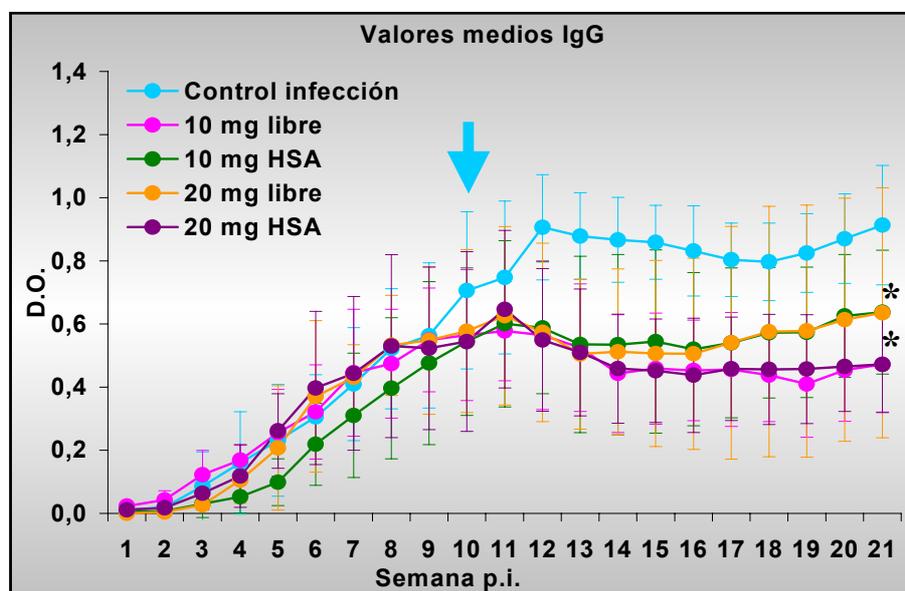
\*  $p < 0.01$

En todos los lotes tratados con anfotericina B poliagregada existe una gran disminución en el número de parásitos tanto en bazo como en hígado con respecto al control de infección (\*  $p < 0.01$ ). Sin embargo, no se llega la curación total de los animales, como ocurría con la dosis de 40 mg/Kg/día. Hay que tener en cuenta que en el lote tratado con la anfotericina B poliagregada libre a la dosis de 20 mg/Kg/día murieron 2 animales en el momento del tratamiento, mientras que en el lote tratado con la misma dosis de anfotericina B poliagregada formulada en HSA esto no ocurrió, y todos los animales sobrevivieron hasta el final del experimento, con lo cual se confirma nuestra teoría de que las microesferas de albúmina son buenas porque permiten la encapsulación de dosis altas de principio activo con ausencia de toxicidad y por lo tanto, se consigue una mayor eficacia.

Resultados



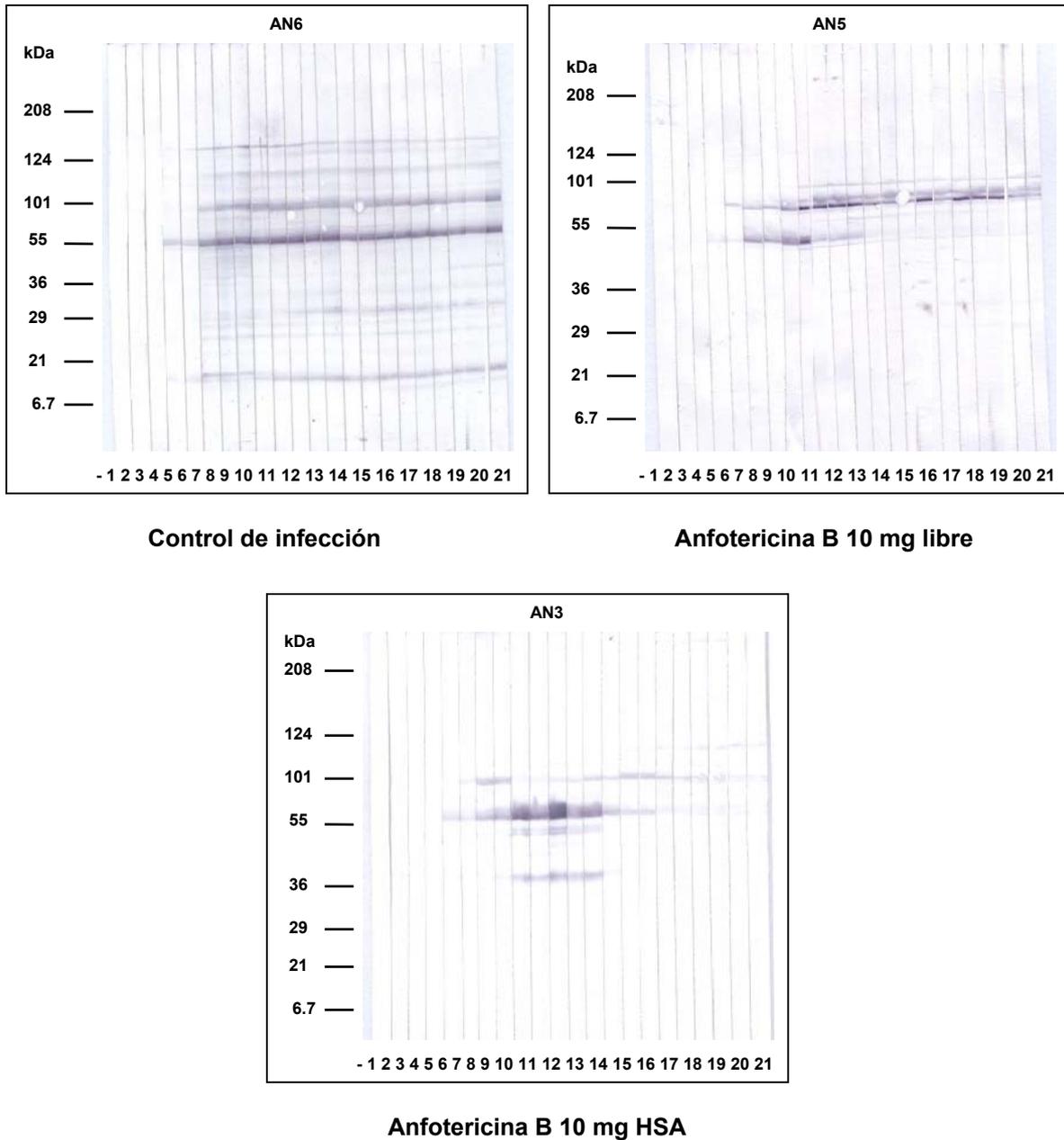
**Figura 30:** Niveles individuales de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. Lote 1: control de infección; Lote 2: anfotericina B 10 mg libre; Lote 3: anfotericina B 10 mg formulada en HSA; Lote 4: anfotericina B 20 mg libre; Lote 5: anfotericina B 20 mg formulada en HSA.



**Figura 31:** Niveles medios de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, en todos los lotes, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. La flecha indica la semana del tratamiento.

La gráfica de los valores medios de IgG muestra que en todos los lotes tratados con anfotericina B existe un descenso o estabilización en los niveles de esta inmunoglobulina a partir de la semana del tratamiento (\*  $p < 0.05$ ), siendo este descenso ligeramente mayor en el lote tratado con la anfotericina B poliagregada encapsulada a la dosis de 20 mg/Kg y en el lote tratado con la anfotericina B poliagregada libre a la dosis de 10 mg/Kg.

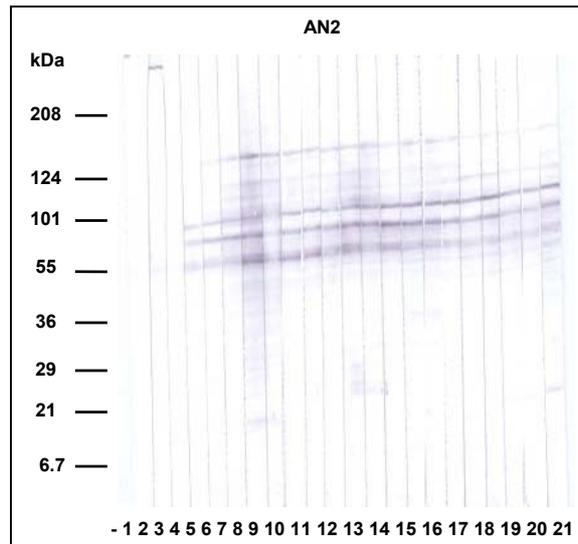
## Resultados



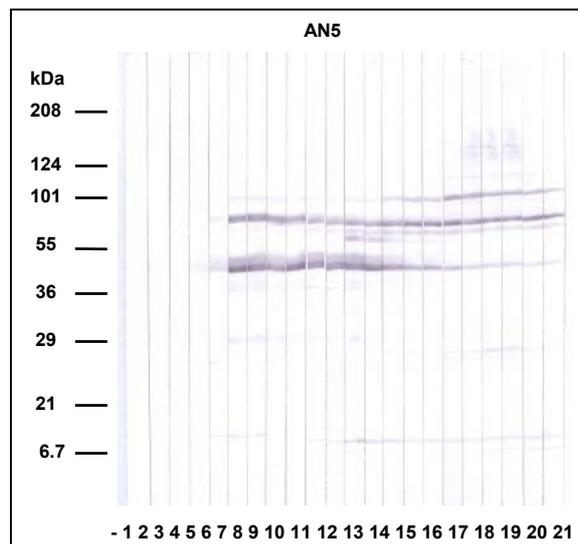
**Figura 32:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75. Lote 1: control de infección; Lote 2: anfotericina B 10 mg libre; Lote 3: anfotericina B 10 mg formulada en HSA.

En el lote control de infección se observan bandas de 16-18, 25, 30, 35, 40, 55, 70, 80-90, 105, 115 y 125 KDa. En el lote tratado con anfotericina B poliagregada libre a la dosis de 10 mg/Kg/día predominan la banda de 55 KDa que desaparece después

del tratamiento, y las de 70, 80-90 y 105 KDa. En aquellos animales tratados con la misma dosis de anfotericina B encapsulada, observamos las bandas de 40, 50 y 55 KDa que desaparecen después del tratamiento, las 80-90 KDa que es más débil que en otras ocasiones y la de 115 KDa que aparece muy débilmente en las últimas semanas.



Anfotericina B 20 mg libre



Anfotericina B 20 mg HSA

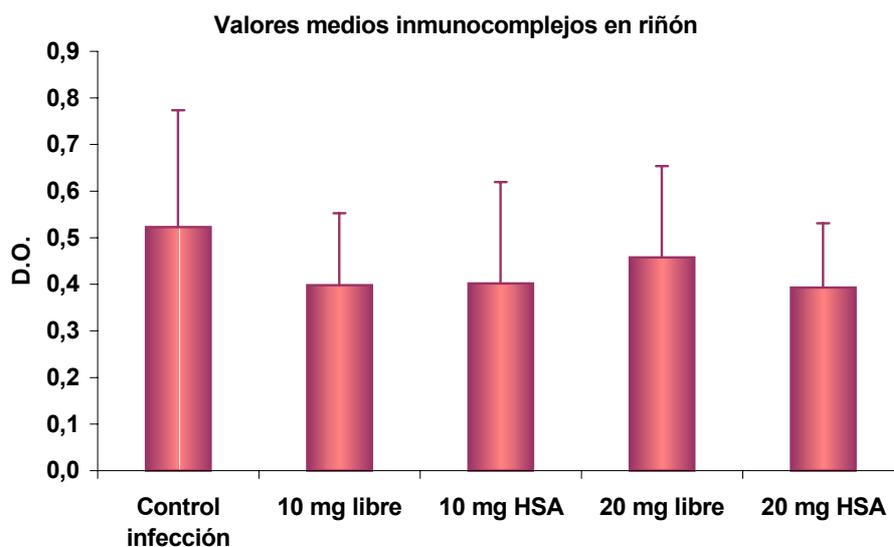
**Figura 33:** Perfiles de reconocimiento antigénico, determinados mediante western-blot frente a antígeno de la cepa LEM75. Lote 4: anfotericina B 20 mg libre; Lote 5: anfotericina B 20 mg formulada en HSA.

## Resultados

En el grupo de animales tratado con la anfotericina B poliagregada libre a la dosis de 20 mg/Kg/día se observan bandas de 55, 70, 80-90, 115, 125 y 150 KDa. En el lote tratado con la misma dosis encapsulada encontramos las bandas de 16-18 KDa, la de 30, que desaparece, la de 55, que se hace menos intensa unas semanas después del tratamiento, 70, 80-90, 115 y 125 KDa, al final del experimento.

### Determinación de inmunocomplejos en riñón.

En este experimento, al igual que en el que se empleó la dosis de 40 mg/Kg peso/día, también decidimos realizar la determinación de los inmunocomplejos en riñón, para comprobar si existía disminución en este parámetro como consecuencia de la alta eficacia conseguida.



**Figura 34:** Valores medios de los inmunocomplejos en el día del sacrificio, expresados en densidades ópticas. **D.O.:** D.O. p-D.O. n.

En esta gráfica se observa que en los lotes tratados con anfotericina B de referencia poliagregada a la dosis de 10 mg/Kg/día, tanto libre como encapsulada, y en el lote tratado con la anfotericina B de referencia poliagregada a la dosis de 20 mg/Kg/día encapsulada existen menos inmunocomplejos a nivel renal que en el lote control de infección. En el lote tratado con la anfotericina B de referencia poliagregada

a la dosis de 20 mg/Kg/día libre no se aprecia casi disminución y esto podría ser debido, posiblemente, a la mayor toxicidad de esta preparación.

**Tabla 37:** Porcentaje de la subpoblación linfocitaria CD4+ en bazo, el día del sacrificio (145 p.i.). También se determinaron en los controles de cricetos sanos.

Lote	Animal	% CD4+	Lote	Animal	% CD4+
Control infección	1	20,06	20 mg libre	2	9,44
	2	24,72		4	9,48
	3	34,98		5	9,67
	5	44,20		Media	9,53 *
	6	25,31		DS	0,12
	Media	29,85			
	DS	9,68			
10 mg libre	1	10,83	20 mg HSA	1	5,93
	2	9,39		2	23,96
	4	7,24		3	10,70
	5	9,28		4	12,04
	6	13,23		5	10,16
	Media	9,99 *		6	11,69
	DS	2,22	Media	12,41 *	
			DS	6,07	
10 mg HSA	1	7,06	Control sano	1	18,64
	2	7,58		2	22,80
	3	9,88		3	25,04
	4	11,28		Media	22,16
	5	12,54		DS	3,25
	6	6,85			
Media	9,20 *				
	DS	2,39			

En este caso, se produce un ligero aumento de la población CD4+ en el lote control de infección con respecto al sano, debido a que en dos animales del lote existen porcentajes más altos de células CD4+, coincidiendo con sus mayores niveles de anticuerpos durante todo el experimento. En todos los lotes tratados con la anfotericina B poliagregada existe una disminución de la subpoblación CD4+ con respecto al lote control de infección (\*  $p < 0,05$ ), independientemente de la dosis, al igual que ocurría con la dosis de 40 mg/Kg/día.

**Resultados**

**Tabla 38:** Índices de estimulación correspondientes a las pruebas de linfoproliferación *in vitro* frente a mitógenos (concanavalina A y fitohemaglutinina) y antígenos (LEM75 y BCN150) en bazo, el día 145 p.i. Se consideró que había existido proliferación cuando  $IE \geq 2$ .

		Índices de estimulación (IE)			
		Mitógenos		Antígenos	
Lote	Animal	Con A	Fitoh.	LEM75	BCN150
Control infección	1	1.30	1.00	1.09	0.77
	2	1.32	1.71	1.33	0.99
	3	1.59	0.31	0.62	0.35
	5	1.57	0.82	1.42	0.35
	6	1.51	1.50	2.12	2.01
	<b>Media</b>	<b>1.46</b>	<b>1.07</b>	<b>1.31</b>	<b>0.89</b>
<b>DS</b>	<b>1.07</b>	<b>0.56</b>	<b>0.55</b>	<b>0.68</b>	
10 mg libre	1	4.21	1.90	1.57	2.53
	2	2.68	2.61	0.84	1.94
	4	3.33	1.32	1.38	1.91
	5	6.9	2.74	0.87	1.39
	6	6.66	1.81	3.29	3.29
	<b>Media</b>	<b>4.76</b>	<b>2.07</b>	<b>1.59</b>	<b>2.21</b>
<b>DS</b>	<b>1.93</b>	<b>0.52</b>	<b>1.00</b>	<b>0.64</b>	
10 mg HSA	1	6.35	1.94	2.84	1.34
	2	2.94	1.80	3.04	2.91
	3	6.03	1.99	2.54	4.65
	4	5.25	1.36	2.70	1.37
	5	3.70	1.57	3.32	2.62
	6	5.21	3.28	1.52	1.44
<b>Media</b>	<b>4.91</b>	<b>1.99</b>	<b>2.66</b>	<b>2.38</b>	
<b>DS</b>	<b>1.33</b>	<b>0.67</b>	<b>0.56</b>	<b>1.18</b>	
20 mg libre	2	7.10	1.87	1.77	1.66
	4	6.98	1.00	2.92	3.72
	5	6.54	3.17	3.24	2.72
	<b>Media</b>	<b>6.87</b>	<b>2.01</b>	<b>2.64</b>	<b>2.70</b>
<b>DS</b>	<b>0.29</b>	<b>1.09</b>	<b>0.63</b>	<b>1.03</b>	
20 mg HSA	1	5.90	3.31	2.51	2.65
	2	5.70	3.78	2.93	1.51
	3	4.88	2.91	2.80	2.82
	4	7.23	2.73	2.80	2.80
	5	8.05	2.82	2.62	2.60
	6	5.91	4.32	4.00	1.76
<b>Media</b>	<b>6.28</b>	<b>3.31</b>	<b>2.94</b>	<b>2.35</b>	
<b>DS</b>	<b>1.15</b>	<b>0.57</b>	<b>0.49</b>	<b>0.52</b>	
Control sano	1	24.31	6.16	1.88	1.37
	2	29.62	2.70	2.02	1.35
	3	22.12	9.09	0.58	1.17
	<b>Media</b>	<b>25.35</b>	<b>5.96</b>	<b>1.49</b>	<b>1.30</b>
<b>DS</b>	<b>3.86</b>	<b>3.20</b>	<b>0.79</b>	<b>0.11</b>	

En todos los lotes tratados con la anfotericina B poliagregada encapsulada o no, existe un aumento de la proliferación celular frente a concanavalina A, con

respecto al lote control de infección, coincidiendo con el gran descenso de la carga parasitaria producido en dichos lotes. Sin embargo, dicho aumento no llega a alcanzar los valores de las células de los animales sanos, debido probablemente a que aún existen algunos parásitos en bazo e hígado. Frente a fitohemaglutinina, existe proliferación celular en todos los animales del lote tratado con la anfotericina B poliagregada encapsulada a la dosis de 20 mg/Kg/día, pero solamente se observa proliferación en 2 animales del lote tratado con la anfotericina B poliagregada libre a la dosis de 10 mg/Kg/día, en un animal del lote tratado con la anfotericina B poliagregada encapsulada a la dosis de 10 mg/Kg/día y en un animal del lote tratado con la anfotericina B poliagregada libre a la dosis de 20 mg/Kg/día. En el caso de los antígenos, existe proliferación en un mayor número de animales en los lotes tratados con la anfotericina B poliagregada encapsulada, sobre todo al emplear la cepa LEM75. Por lo tanto, a estas dosis, además de recuperar la proliferación frente a concanavalina A, también se consigue reestablecer la inmunidad mediada por células antígeno-específica, tal y como ocurría al emplear la dosis de 40 mg/Kg/día.

## **7. EFECTO DE LA ANFOTERICINA B POLIAGREGADA FORMULADA EN HSA, SOBRE LA POBLACION CD4+ ESPLENICA EN CRICETOS SANOS.**

En las dos últimas pruebas se ha observado un descenso en el porcentaje de células CD4+, al emplear las dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada encapsulada en microesferas de HSA. Por ello, a fin de comprobar una posible acción directa de la anfotericina B sobre esta población linfocitaria, se diseñó una prueba adicional con animales no infectados. Así mismo, se midió la expresión de citoquinas mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, tal y como se indica más adelante (apartado 9). Para ello se dispusieron 3 lotes homogéneos de cricetos machos:

**Lote 1:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado**, a la dosis de 2 mg/Kg peso/día, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 2:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado**, a la dosis de 40 mg/Kg peso/día, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 3:** Controles sanos, sin tratamiento.

La administración se efectuó en los días **69, 71 y 73**. La mitad de los animales fueron sacrificados el día **76 (día 3 post-tratamiento)** y la otra mitad el día **145 (día 72 post-tratamiento)**.

En este experimento murieron los animales 7 y 8 del lote 1 y el 6 del lote 2, antes de la finalización del mismo.

**Resultados**

**Tablas 39 y 40:** Porcentaje de la subpoblación CD4+ el día 76 p.i. (3 p.t.) y el día 145 p.i. (72 p.t.)..

Lote	Día 76 p.i. (3 p.t.)		Día 145 p.i. (72 p.t.)	
	Animal	% CD4+	Animal	% CD4+
2 mg/Kg	1	34,20	6	39,49
	2	34,52	-	-
	3	34,55	-	-
	4	37,67	9	36,23
	5	30,53	10	48,54
	<b>Media</b>	<b>34,29 *</b>	<b>Media</b>	<b>41,42 **</b>
	<b>DS</b>	<b>2,53</b>	<b>DS</b>	<b>5,20</b>
40 mg/Kg	1	34,49	-	-
	2	39,08	7	28,02
	3	38,92	8	36,25
	4	29,97	9	26,70
	5	16,24	10	14,21
	<b>Media</b>	<b>31,74 *</b>	<b>Media</b>	<b>26,29 *</b>
	<b>DS</b>	<b>9,44</b>	<b>DS</b>	<b>7,87</b>
Control	1	50,33	5	31,15
	2	45,15	6	34,67
	3	36,61	7	32,61
	4	33,39	-	-
	<b>Media</b>	<b>41,37</b>	<b>Media</b>	<b>32,81</b>
	<b>DS</b>	<b>6,72</b>	<b>DS</b>	<b>1,77</b>

Tanto en el día 3 p.t. como en el día 72 p.t. a la dosis de 40 mg/Kg/día, se produce un descenso en la proporción de linfocitos CD4+ esplénicos (\*  $p < 0.05$ ). Sin embargo, esta proporción se incrementa a los 72 días p.t. a la dosis de 2 mg/Kg/día, con respecto a los animales controles (\*\*  $p < 0.05$ ).

## 9. TRATAMIENTO EN EL PERIODO SINTOMATICO CON ANFOTERICINA B POLIAGREGADA, FORMULADA EN ACIDO POLILACTICO-CO-GLICOLICO. COMPARACION CON FUNGIZONA®.

En esta prueba decidimos probar otros polímeros alternativos a la albúmina sérica humana (HSA).

Decidimos probar las microesferas de Acido Poliláctico-co-glicólico (Polilactato-co-glicolato). Se probaron dos tipos de Polilactatos diferentes: **Resomer® RG-502 (PLGA RG-502)** y **Resomer® RG-503 (PLGA RG-503)** (Boehringer Ingelheim Pharma K.G.). De nuevo se introdujo la anfotericina B de referencia en estado poliagregado a la dosis de 2 mg/Kg peso/día, con fines comparativos. También incluimos un lote tratado con microesferas de PLGA vacías, en concreto las de PLGA RG-502.

Hasta ahora en ninguna prueba habíamos incluido ningún lote tratado con anfotericina B de marca comercial registrada y por eso, incluimos un lote tratado con Fungizona®. Para este experimento, por lo tanto, se emplearon lotes homogéneos de 5-6 cricetos machos que fueron infectados por vía intracardiaca con  $10^7$  promastigotes de “reciente aislamiento” de la cepa BCN150 de *L. infantum*. Los lotes fueron los siguientes:

**Lote 1:** Control de infección.

**Lote 2:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado**, formulada en microesferas de Polilactato-Glicolato (PLGA) RG-502.

**Lote 3:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado**, formulada en microesferas de PLGA RG-503.

**Lote 4:** Microesferas de PLGA RG-502 vacías.

**Lote 5:** Anfotericina B comercial, **Fungizona®**.

El tratamiento se realizó en el periodo sintomático de la enfermedad los días **69, 71 y 73 p.i.**, por vía intracardiaca y el sacrificio de los animales los días **145-146 p.i.**

## Resultados

Durante el proceso de infección o durante la semana del tratamiento murieron los animales 1 y 5 del lote 1, el 4 y 5 del lote 2, el 3 y 5 del lote 3, el 2, 5 y 6 del lote 4 y el 1, 3 y 5 del lote 5.

**Tabla 41:** Pesos de los animales en gramos a lo largo del experimento, se incluyó un lote de controles sanos, es decir, no infectados con el parásito.

		Pesos de los animales a lo largo del experimento									
		Semana p.i.									
Lote	Ani.	Pre.	3 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
Control infección	2	94.6	135	140.2	112.6	93	78	61.8	72.5	67.8	66.05
	3	91.2	124	136.5	138	144	122.7	93	91.2	79	80.6
	4	84.1	125	138.5	130	148	153	144	135.3	118.2	116.4
	6	67	113	119.9	123	131	131.9	111.5	109.4	87	72.4
	Media	84.2	124.2	133.8	125.9*	129*	121.4*	102.6*	102.1*	88*	83.9*
	DS	10.6	7.8	8.1	9.3	21.7	27.3	34,4	26,8	21,6	22,5
PLGA RG-502	1	86	128	133.2	138	142	157.2	157.4	159	116.8	96.6
	2	91.1	128	133	141	134	116	88	83	72.5	74.2
	3	96	142	148	151	146	154.8	156.2	162	163	159.8
	6	79	125	139.4	144	154	161	165	172	174.3	165.7
	7	82.1	115	130.5	141	134	131.8	133.8	139.4	140.6	134.7
	Media	86.8	127.6	136.8	143	141.2	144,2*	140,1*	143,1*	133,4*	126,2*
DS	6.1	8.6	6.3	4.4	7.6	19,4	31,4	35,6	40,6	39,8	
PLGA RG-503	1	84.9	128.6	137	133	131	132.2	128.2	125	97.7	91.69
	2	98	141	144.8	138	135	111.9	88.4	88	97.8	82.23
	4	79.9	127	129.2	139.6	156	163.9	177.8	183.9	181.6	179.4
	6	75.8	113	115.6	126.2	132	142.8	130.6	131.7	90.8	91.75
	Media	84.6	127.4	131.6	134.2	138.5	137.7*	131.2*	132.2*	117*	111,3*
	DS	8.3	9.9	10.8	5.2	10.2	18.7	31.6	34.2	43,2	45,6
PLGA RG-502 vacías	1	83	128	138.7	138	132	97.7	85.4	84	71	79.3
	3	96.3	134	137	150	156	150	131.5	112	88	85.5
	4	87.2	128	137.3	147.3	158	161.3	140.8	123.7	93.2	94.85
	Media	88.8	130	137.6	148.6	148.6	136,3*	119,2*	106,6*	84,1*	86,6*
	DS	5.5	2.8	0.7	8.2	11.8	33,9	29,7	20,4	11,6	7,8
	Fungizona	2	95	136	149	158	96	84	75	73	66.4
4		83.4	130	121.3	122	131	150.6	133	100	76	79.2
6		81.8	137	137.2	143	162	179	172	156	137.1	140.0
Media		86.7	134.3	135.8	141	129.6*	137.8*	126.6*	109.6*	93.1*	96,2*
DS		5.9	3.1	11.3	14.7	26.9	39.8	39.8	34.6	31.3	38,2
Control sano		1	86.1	120	139	137.2	145	153	152	157	159.2
	2	93	123	128.8	133	142	152	150	157	156.8	156.6
	3	80.4	117	126	127	133	144	143	146	152.7	150.7
	4	85.1	128	135	140.8	146	157	158	164	167.6	163.8
	Media	86,2	122	132,2	134,5	141,5	151,5	150,8	156	159,1	157,4
	DS	5,2	4,7	5,9	5,9	5,9	5,4	6,2	7,4	6,3	5,4

En el grupo de los animales sanos se observa un aumento progresivo del peso a lo largo de todo el experimento, cosa que no ocurre en los lotes infectados con *L. infantum*, ya que en el lote control de infección los valores medios muestran que existe un aumento de peso hasta la semana 13<sup>a</sup> p.i., con posterior disminución con respecto al grupo sano (\*  $p < 0.05$ ), con un valor medio de 83.9 gramos. Esto también ocurre en los dos lotes tratados con la microesferas de PLGA RG-503 (\*  $p < 0.05$ ), con valores medios de peso en la última semana de 111.3 gramos. En el lote tratado con las microesferas de PLGA RG-502 el peso aumenta hasta la semana 17<sup>a</sup> y a partir de ahí disminuye (\*  $p < 0.05$ ), con valores medios de 126.2 gramos en la última semana. En el lote tratado con las microesferas de PLGA RG-502 vacías el peso de los animales aumenta hasta la semana 10<sup>a</sup> p.i. y a partir de ahí disminuye con valores medios de 86.6 gramos en la última semana (\*  $p < 0.05$ ). Por último, en el lote tratado con Fungizona<sup>®</sup> el peso aumenta hasta la semana 7<sup>a</sup> p.i., en la semana del tratamiento disminuye para luego volver a aumentar hasta la semana 13<sup>a</sup> p.i y luego volver a descender (\*  $p < 0.05$ ), hasta valores de 96.2 gramos en la última semana.

**Resultados**

**Tabla 42:** Pesos de los órganos (bazo e hígado) en gramos y carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite, en el día del sacrificio.

Lote	Animal	Pesos órganos		Amastigotes/mg órgano (x 10 <sup>6</sup> )	
		Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
Control infección	2	0.62	5.28	0.898	0.173
	3	1.14	6.83	1.57	11.1
	4	1.05	7.62	0.209	0.035
	6	0.61	5.66	33.55	0.527
	Media	<b>0.85 *</b>	<b>6.34 *</b>	<b>9.05</b>	<b>2.95</b>
	DS	<b>0.24</b>	<b>0.93</b>	<b>14.14</b>	<b>4.7</b>
PLGA RG-502	1	1.21	7.44	3.87	4.12
	2	0.80	6.68	8.38	0.065
	3	0.93	10.51	0.00189	0.0367
	6	1.30	9.98	0.046	0.00025
	7	0.21	7.36	0.00136	0.000037
	Media	<b>0.89 *</b>	<b>8.39</b>	<b>2.45 *</b>	<b>0.844 *</b>
DS	<b>0.38</b>	<b>1.54</b>	<b>3.31</b>	<b>1.63</b>	
PLGA RG-503	1	0.63	6.63	0.838	0.065
	2	0.72	6.19	2.51	0.137
	4	0.66	10.89	0.0027	0.00093
	6	0.76	7.44	8.38	8.52
	Media	<b>0.69 *</b>	<b>7.78</b>	<b>2.93 *</b>	<b>2.18</b>
	DS	<b>0.050</b>	<b>1.84</b>	<b>3.27</b>	<b>3.66</b>
PLGA RG-502 vacías	1	0.85	7.14	6.42	2767.2
	3	1.35	6.36	5.21	0.156
	4	1.19	7.53	12.58	1451.8
	Media	<b>1.13 *</b>	<b>7.01</b>	<b>8.07</b>	<b>1406.38</b>
	DS	<b>0.20</b>	<b>0.48</b>	<b>3.22</b>	<b>1130.09</b>
	Fungizona	2	0.67	5.69	9370.9
4	0.92	5.86	4585.45	364137.9	
6	1.32	10.33	805.31	0.328	
Media	<b>0.97 *</b>	<b>7.29</b>	<b>4920.55</b>	<b>121834.5</b>	
DS	<b>0.26</b>	<b>2.14</b>	<b>3504.9</b>	<b>171335.2</b>	
Control sano	1	0.13	7.63	-	-
	2	0.14	8.71	-	-
	3	0.15	8.10	-	-
	4	0.23	7.40	-	-
	Media	<b>0.16</b>	<b>7.96</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
	DS	<b>0.039</b>	<b>0.50</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

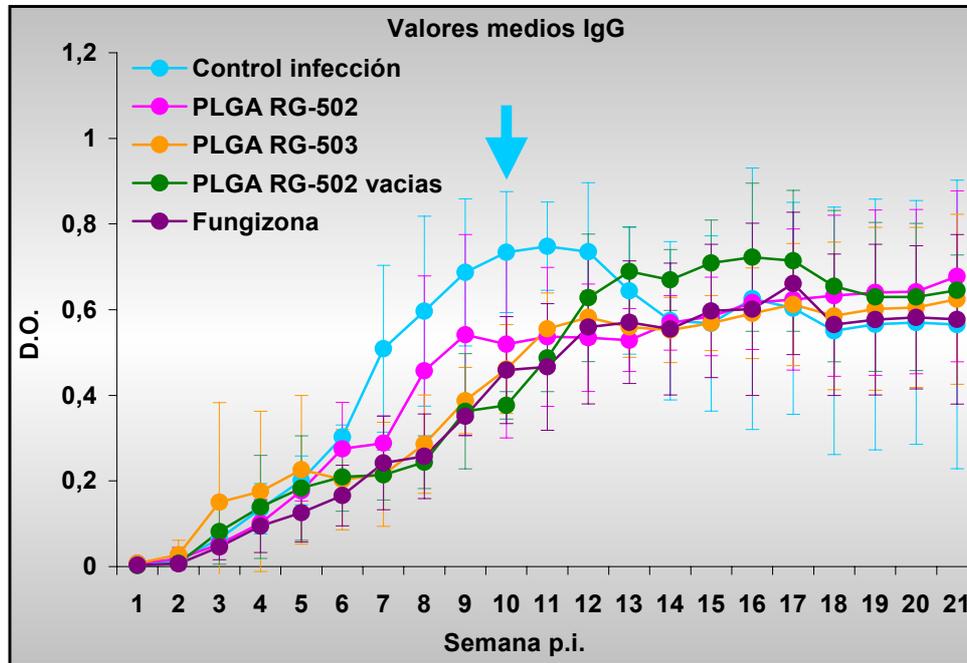
En todos los animales infectados con el parásito existe una marcada esplenomegalia (\* p< 0.05). En cuanto a los hígados, los pesos son menores en el lote control de infección, con respecto a los animales sanos (\* p< 0.05).

**Tabla 43:** Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de todos los lotes respecto al control de infección, tanto en bazo como en hígado.

	% REDUCCION DE LA CARGA PARASITARIA RESPECTO AL CONTROL INFECCION	
	Bazo	Hígado
<b>RG-502</b>	72.92 *	71.38 *
<b>RG-503</b>	67.62 *	26.1
<b>RG-502 vacias</b>	10.82	Exacerba la infección
<b>Fungizona®</b>	Exacerba la infección	Exacerba la infección

\* p< 0.05

La Fungizona® no produce ninguna eficacia. En cuanto a las formulaciones de PLGA, la RG-502 presenta una mayor eficacia (\* p< 0.05), que la RG-503 sobre todo en hígado, sin embargo, no se llegan a alcanzar la eficacias de más del 90% que conseguíamos con las microesferas de albúmina sérica humana y si tenemos en cuenta los valores individuales en muchos animales no existe reducción de la carga parasitaria en ese momento del sacrificio.



**Figura 35:** Niveles medios de IgG, frente a antígeno de la cepa LEM75, en todos los lotes, determinados mediante ELISA indirecto. D.O.: D.O. p-D.O. n. La flecha indica la semana del tratamiento.

A pesar de que en los lotes tratados con microesferas de PLGA conteniendo anfotericina B existía reducción de la carga parasitaria, no se observan diferencias significativas en los niveles medios de IgG entre los distintos lotes a partir de la semana del tratamiento (10<sup>a</sup> p.i.).

No se muestran los western-blots, ni los datos de respuesta celular porque no aportan gran información. Solamente en algunos animales tratados con la microesferas de PLAG existe proliferación frente a concanavalina A.

## **9. PUESTA A PUNTO DE UNA TECNICA DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL PARA LA DETERMINACION DE CITOQUINAS Y CARGA PARASITARIA EN CRICETO.**

### **9.1. Determinación de citoquinas.**

Como ya se ha indicado anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo era la puesta a punto de métodos para la determinación de citoquinas, dada la ausencia de reactivos comerciales en criceto. La técnica elegida fue la RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

Esta técnica permite realizar ensayos de expresión génica, que se puede medir mediante la cuantificación de cDNA, obtenido a partir de RNA mensajero correspondiente al gen de estudio, en relación con una muestra de referencia (“calibrator sample”) que sirve como referencia fisiológica. En un experimento típico, los niveles de expresión génica se estudian para ver el efecto de un tratamiento sobre células de cultivo, de pacientes o de un tipo de tejido. La muestra de referencia (“calibrator sample”) en cada caso es el cDNA de unas células no tratadas o de un tejido específico. Además, todas las cuantificaciones se normalizan con relación a un gen control endógeno (“housekeeping”), es decir, un gen que siempre se expresa, para evitar la variabilidad en la concentración inicial y calidad del RNA y en la eficiencia de conversión de la reacción de transcripción reversa. Por otro lado, también es necesario incluir otro control (“NTC: Non Template Control”) en el que no se incluye material genético, para comprobar que no haya contaminaciones o reacciones inespecíficas.

El que el proceso se realice a tiempo real significa que la cuantificación se hace durante el propio proceso de amplificación y esto es así porque, por la propia cinética de la reacción, llega un momento en el que cuando faltan reactivos no se amplifica más. Se define así **Ct** como el primer ciclo de amplificación donde se detecta la señal y es en esa zona donde se realiza la cuantificación. Es necesario emplear tubos ópticos o placas de 96 pocillos especiales para evitar interferencias.

## Resultados

En nuestro caso, para la amplificación hemos empleado el reactivo comercial **SYBR® Green I Dye** (Applied Biosystems). La detección directa del producto de PCR es monitorizada midiendo el incremento de fluorescencia causado por la unión del SYBR Green Dye a la doble cadena del DNA. Lo que se registra es el segmento de fluorescencia frente al número de ciclos y es necesario convertir la fluorescencia en concentración de DNA. Para ello lo que se hace es una representación logarítmica del segmento y se determina el Ct que coincide con el centro de la pendiente que se forma entre el inicio y la zona lineal (ejemplos en las figuras 38, 41, 43 y 45).

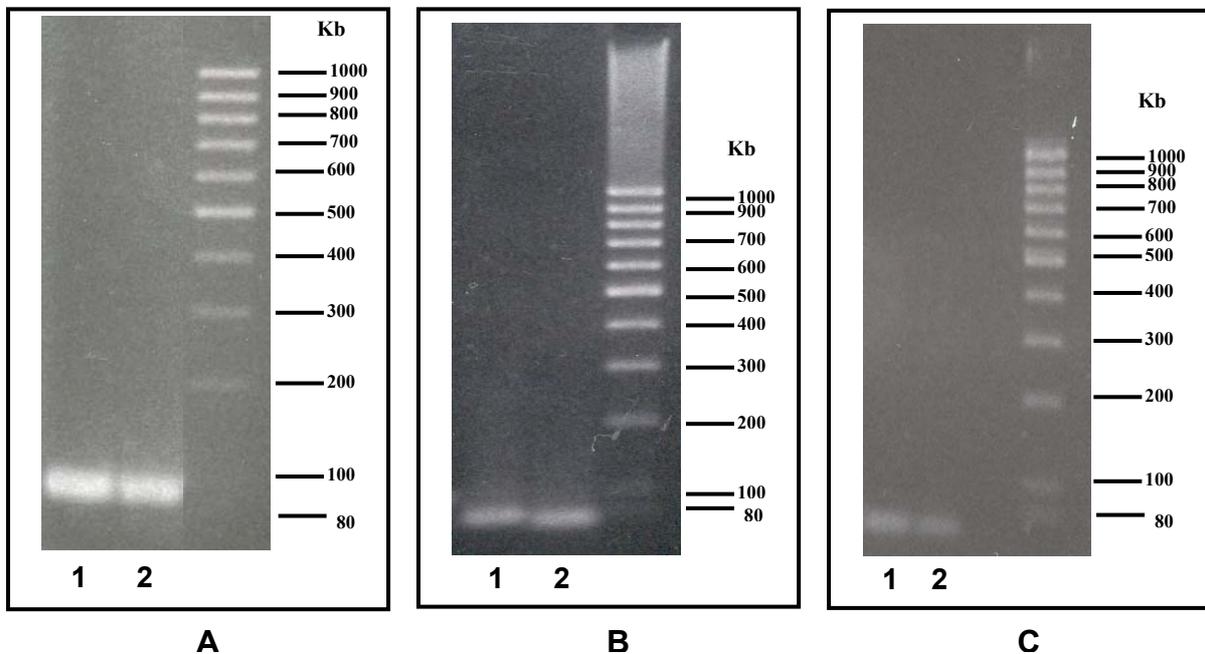
Para hacer los cálculos se pueden comparar los Ct entre el gen problema y el gen endógeno si las rectas de Ct y log[DNA] son paralelas entre los dos genes. En ese caso, se emplea el método matemático del  $\Delta\Delta Ct$  que es un fórmula matemática muy compleja. Para facilitar el cálculo, la casa comercial (Applied Biosystems) dispone de hojas de cálculo en formato Excel.

Pero si las dos rectas no son paralelas se debe realizar una curva estándar con distintas diluciones de DNA (ejemplos en las figuras 37, 40, 42 y 44). En este caso las muestras problema expresarán un número determinado de copias y el aparato, una vez hecha la curva, interpolará los datos en ella. Para realizar los cálculos se divide la cantidad de producto del gen problema entre la cantidad de producto del gen endógeno y posteriormente se refiere al “calibrator sample”. Más adelante veremos un ejemplo.

En nuestro caso, hemos puesto a punto la técnica para determinar la expresión génica de las siguientes citoquinas: IL-4, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , empleando como gen endógeno el HPRT (Hipoxantina fosforribosiltransferasa). En el apartado 27 del capítulo de Material y Métodos ya se ha detallado como se diseñaron los cebadores a partir de las secuencias cDNA para cada citoquina publicadas en el GeneBank por Melby y col. en 1998, así como las condiciones de la PCR (concentraciones, ciclos, temperaturas, etc).

Para la realización de esta técnica es necesario obtener un solo producto de amplificación y para obtener las condiciones óptimas se realizaron en un primer lugar PCRs convencionales. Los productos de amplificación obtenidos con las parejas de cebadores elegidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3% y se

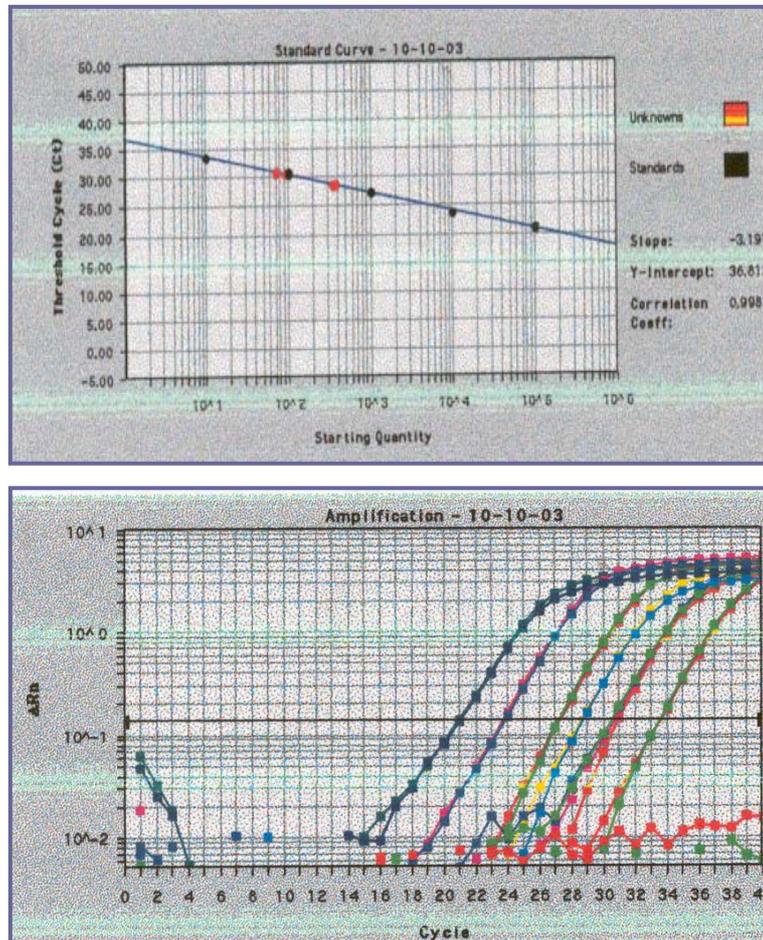
visualizaron mediante baño en Bromuro de Etidio. Dichos geles se muestran a continuación y en ellos se puede observar que efectivamente solo existe un producto de amplificación y su tamaño:



**Figura 36:** Geles correspondientes a los productos de amplificación para los genes: HPRT, IL-4, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ . El gel **A** muestra un producto de amplificación de 91 Kb para HPRT con dos muestras (1 y 2) de DNA genómico de criceto. El gel **B** muestra los productos de amplificación para IL-4 (1) y IFN- $\gamma$  (2) a partir de DNA genómico de criceto con tamaños de 72 y 68 Kb respectivamente. Por último, el gel **C** muestra el producto de amplificación para TGF- $\beta$  a partir de 2 muestras de DNA genómico de criceto (1 y 2) con un tamaño de 57 Kb.

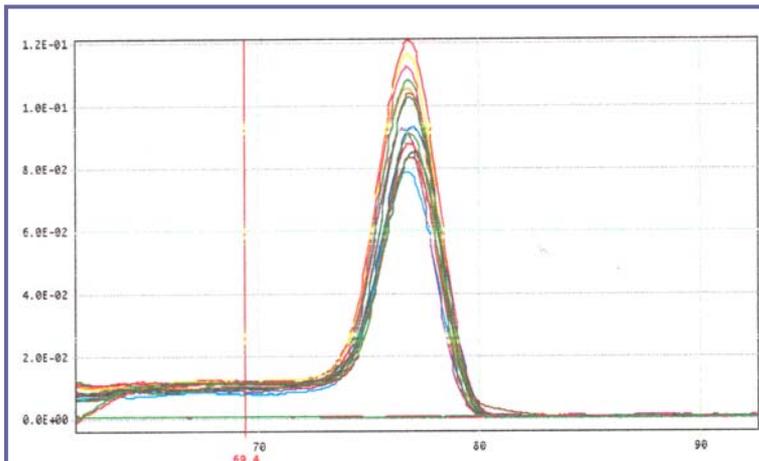
Una vez fijadas las condiciones de trabajo se procedió a realizar la PCR cuantitativa. En las siguientes imágenes se muestran ejemplos de la curvas estándares de DNA genómico así como de los ciclos de amplificación.

## Resultados



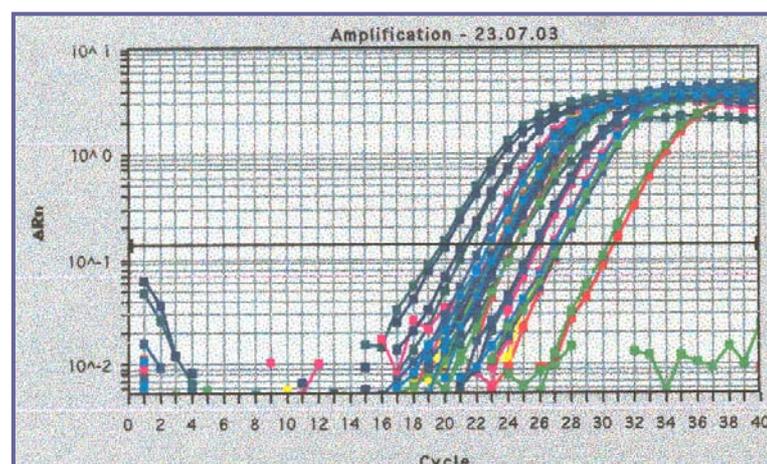
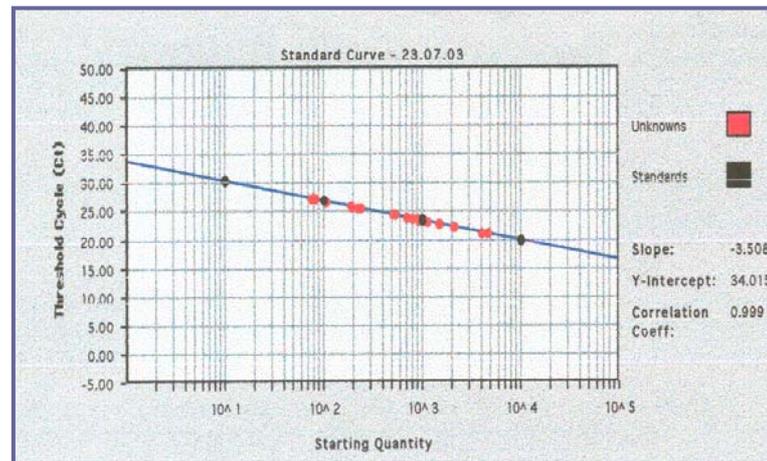
**Figuras 37 y 38:** Ejemplos de curva estándar de DNA genómico de criceto y de representación gráfica de los ciclos de amplificación para el gen *HPRT*. En la figura superior se observan dos puntos rojos que corresponden a dos muestras de cDNA que caen dentro de la curva (puntos negros).

Además, para confirmar que solo existía un producto de amplificación se realizaron las curvas de disociación de los cebadores, que son gráficas que muestran datos de los amplicones de cada muestra sometida a la PCR cuantitativa en las que se representan los cambios en la fluorescencia frente a la temperatura. Esto sirve para ver productos no específicos, como dímeros de cebadores que pueden afectar a la calidad de los datos de amplificación. Los dímeros de cebadores son más probable que aparezcan en la muestras NTC o en pocillos con baja concentración de muestra.



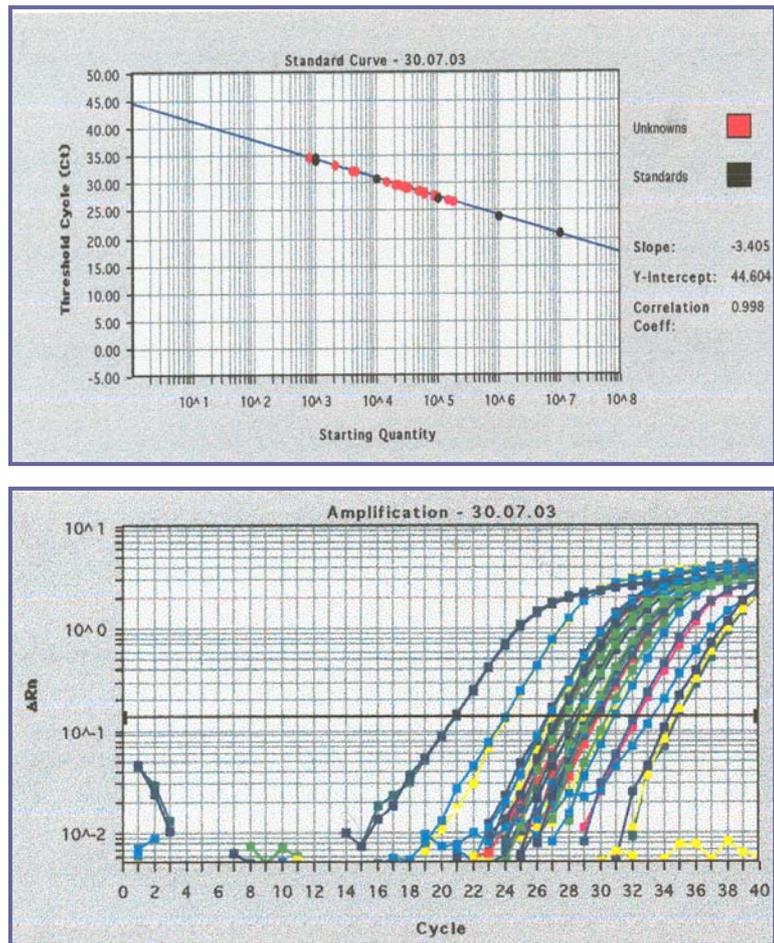
**Figura 39:** Ejemplo de curva de disociación para el gen endógeno HPRT. Efectivamente, existe un solo producto de amplificación y no hay productos inespecíficos.

A continuación se muestran ejemplos para los demás genes:

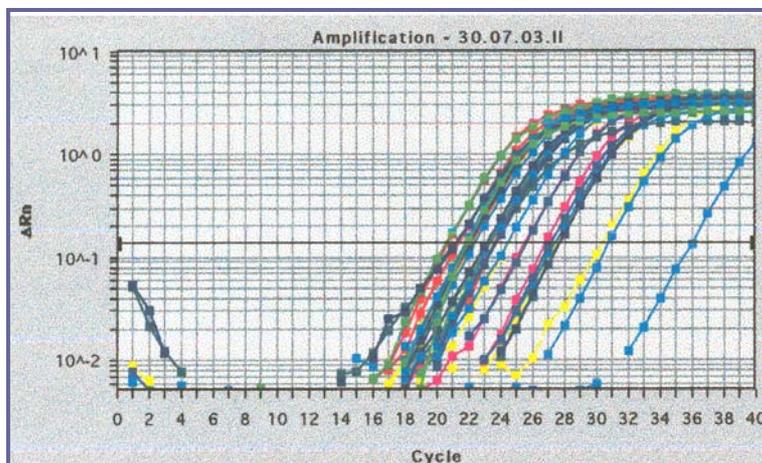
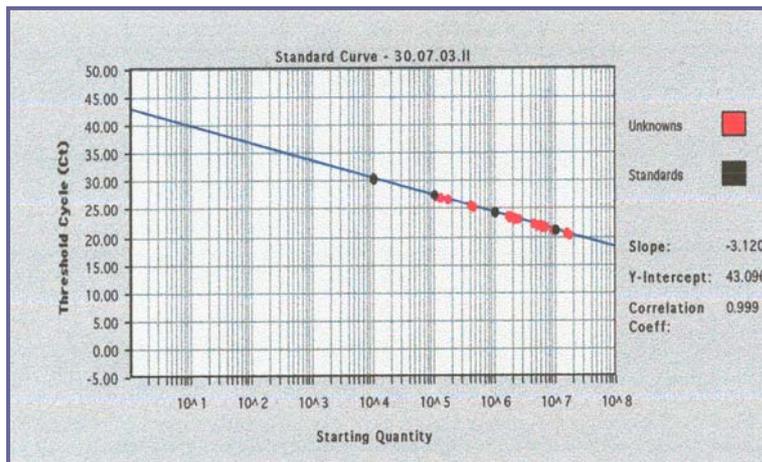


**Figuras 40 y 41:** Ejemplos de curva estándar de DNA genómico de criceto y de representación gráfica de los ciclos de amplificación para IL-4. En la figura superior se observan varios puntos rojos que corresponden a muestras de cDNA.

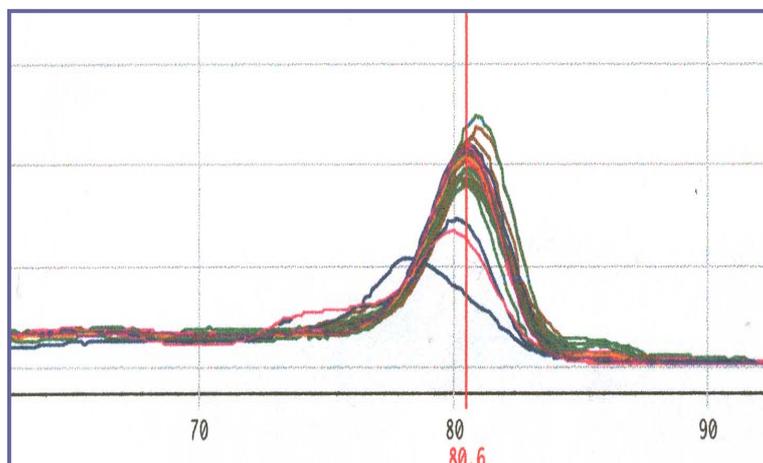
## Resultados



**Figuras 42 y 43:** Ejemplos de curva estándar de DNA genómico de criceto y de representación gráfica de los ciclos de amplificación para IFN- $\gamma$ . En la figura superior se observan varios puntos rojos que corresponden a muestras de cDNA.



**Figuras 44 y 45:** Ejemplos de curva estándar de DNA genómico de criceto y de representación gráfica de los ciclos de amplificación para TGF- $\beta$ . En la figura superior se observan varios puntos rojos que corresponden a muestras de cDNA.



**Figura 46:** Ejemplo de curva de disociación para el gen TGF- $\beta$ .

## Resultados

Para comprobar la utilidad de la técnica se determinó la expresión de citoquinas en muestras de cDNA correspondientes al experimento de puesta a punto del modelo y a algunos experimentos farmacológicos. Por cuestiones económicas y de tiempo no fue posible realizar estas pruebas en todos los experimentos realizados en este trabajo. Pero lo importante es que se ha logrado poner a punto y se podrá emplear en futuros ensayos en cricetos afectados de leishmaniasis visceral, aportando más datos sobre la respuesta inmune en este modelo.

### **9.1.1. Medida de la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos, correspondiente a la puesta a punto del modelo experimental en criceto (experimento 1.1).**

En este experimento existían dos lotes de cricetos, I y II, infectados con  $10^5$  y  $10^7$  promastigotes de *L. infantum* respectivamente, que se sacrificaron el día 154 p.i. En el día del sacrificio se extrajo el RNAm de los linfocitos de bazo de cada uno de los animales y posteriormente 150 ng del mismo se transformaron en cDNA.

Cuando el aparato realiza el análisis, aporta una serie de datos, como el Ct y, en el caso de que se haya hecho curva estándar de DNA, la cantidad de producto amplificado en cada caso, que ha sido interpolada en la curva. En nuestro caso siempre hemos realizado curvas estándar de DNA, por lo que a la hora de hacer los cálculos no es necesario emplear la fórmula matemática del  $\Delta\Delta Ct$ , sino que los cálculos son mucho más sencillos. El análisis se ha realizado en placas especiales de 96 pocillos y un ejemplo de los cálculos matemáticos sería el siguiente:

**Tabla 44:** Ejemplo de resultados para el cálculo matemático. Cada muestra va por duplicado.

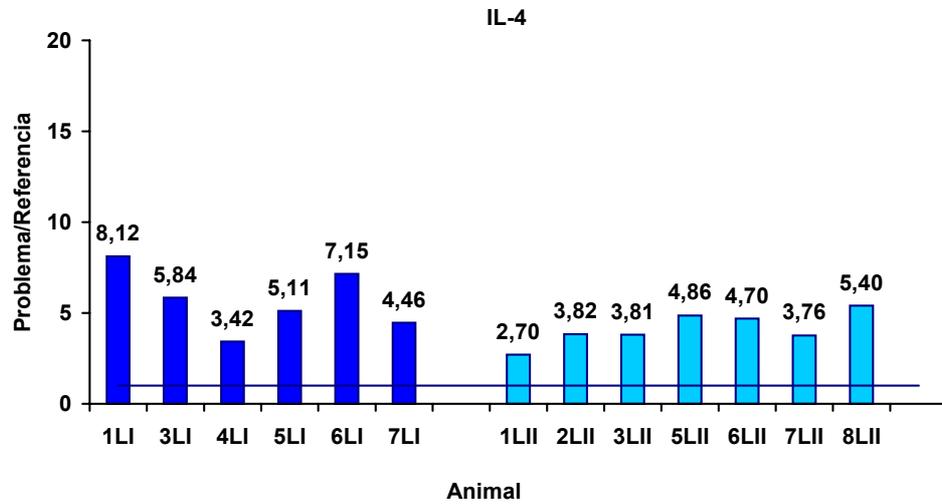
Pocillo	Nombre de la muestra	Ct	Cantidad
A1	HPRT	40	0
A2	HPRT	40	0
A3	IL-4	40	0
A4	IL-4	40	0
B1	1 HPRT	29.17	773.54
B2	1 HPRT	29.15	773.54
B3	2 HPRT	31.56	276.48
B4	2 HPRT	31.60	276.48
B5	1 IL-4	34.01	10933.61
B6	1 IL-4	34.07	10933.61
B7	2 IL-4	29.21	31734.50
B8	2 IL-4	29.25	31734.50

Los pocillos A1 y A2 (duplicados) y A3 y A4 (duplicados) corresponden a las muestras control NTC (sin material genético). Su valor de Ct ha de ser 40 para considerar que no hay ninguna contaminación, ni dímeros de cebadores. Los pocillos B1 y B2 corresponden a la expresión del gen endógeno en la muestra de referencia ("sample calibrator") y los pocillos B5 y B6 corresponden a la expresión del gen para IL-4 en la misma muestra. Los pocillos B3 y B4 corresponden a la expresión del gen endógeno en una muestra problema y los pocillos B7 y B8 corresponden a la expresión del gen para IL-4 en la misma muestra. Para realizar los cálculos en este caso no son necesarios los Ct.

Lo que se hace es dividir la cantidad de B5-B6 (IL-4) entre la de B1-B2 (HPRT) y la de B3-B4 (IL-4) entre la de B7-B8 (HPRT), es decir:  $10933.61/773.54 = 14.13$  y  $31734.50/276.48 = 114.78$ . Al valor 14.13, que es el de la muestra de referencia ("sample calibrator"), se le asigna el valor de 1 y a partir de ahí se hace una regla de tres de manera que si 14.13 es igual a 1, entonces 114.78, que es el valor obtenido con la muestra problema, será X. En este caso  $X = 8.12$ , entonces se considera que en esa muestra hay 8.12 veces más expresión de IL-4 que en la muestra de referencia ("sample calibrator"), que en nuestro caso es siempre el cDNA de un criceto sano.

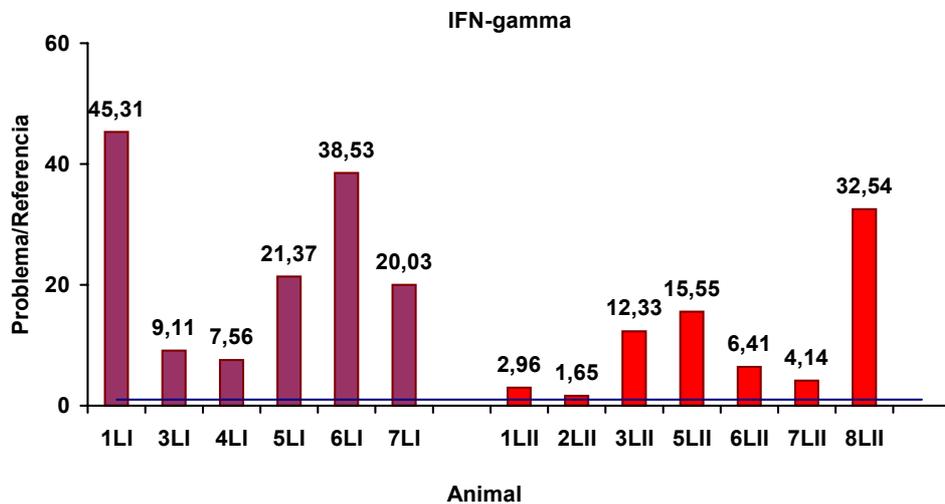
## Resultados

Los resultados de la expresión génica de citoquinas en este experimento fueron los siguientes:



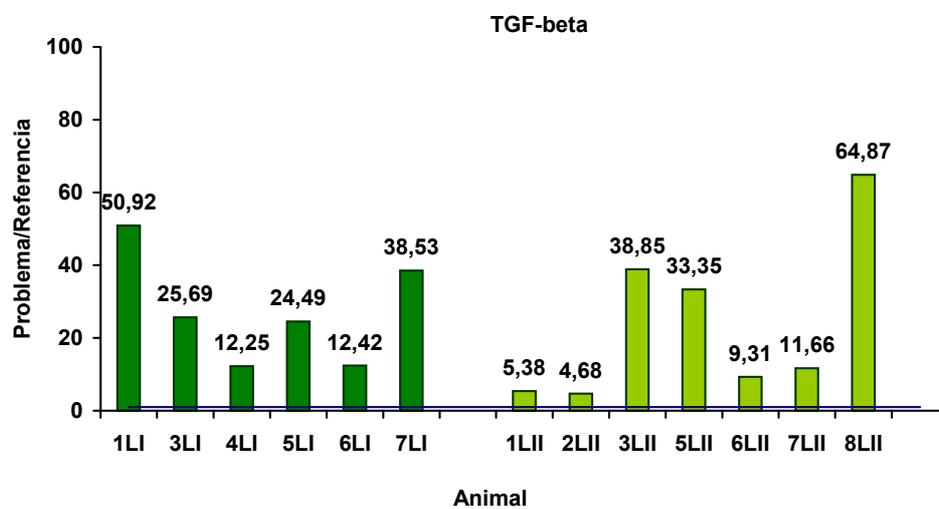
**Figura 47:** Grado de expresión de IL-4 en los lotes I y II.

De forma global, existe una expresión de IL-4 ligeramente mayor en el lote I. La expresión en ambos lotes es menor que para las otras dos citoquinas, tal y como veremos en las dos figuras siguientes.



**Figura 48:** Grado de expresión de IFN- $\gamma$  en los lotes I y II.

A pesar de la gran variabilidad individual, de forma global parece existir más expresión de IFN- $\gamma$  en el lote I que es el infectado con la dosis menor:  $10^5$  promastigotes/criceto.



**Figura 49:** Grado de expresión de TGF- $\beta$  en los lotes I y II.

En ambos lotes existe expresión de este gen y, a pesar de la variabilidad existente no parecen existir diferencias entre los dos de forma global.

**9.1.2. Medida de la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos de cricetos infectados y tratados con la anfotericina B.**

En este experimento se estudio el efecto de las microesferas de albúmina sérica humana conteniendo anfotericina B de referencia en estado poliagregado a las dosis de 2 y 40 mg/Kg peso/día, con sacrificio de los animales a los 3 días post-tratamiento.

Para ello, se dispusieron lotes homogéneos de 5 cricetos machos de 60-70 gramos de peso que fueron infectados por vía intracardiaca con  $10^7$  promastigotes de “reciente aislamiento” de la cepa BCN150 de *L. infantum*. La formulaciones se administraron también por vía intracardiaca los días **69, 71 y 73 p.i.** y el sacrificio se realizó el día **76 p.i. (3 p.t.)**. Los lotes fueron los siguientes:

**Lote 1:** Control de infección.

**Lote 2:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** a la dosis de 2 mg/Kg/día, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 3:** Anfotericina B de referencia en estado **poliagregado** a la dosis de 40 mg/Kg/día, formulada en microesferas de HSA.

**Lote 4:** Controles sanos.

El animal 3 del lote 3 murió antes de finalizar el experimento.

Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 45:** Carga parasitaria en mg de órgano, determinada mediante el método de la dilución límite en el día del sacrificio, tanto en bazo como en hígado.

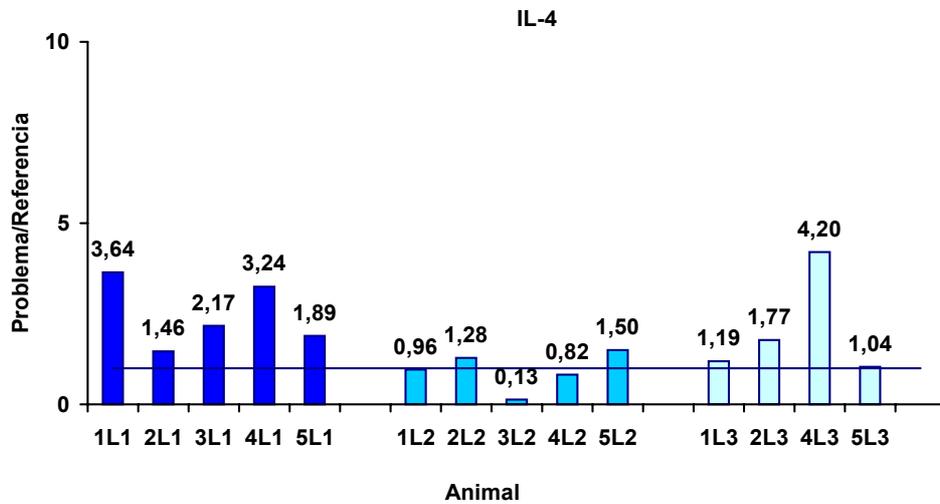
		Promastigotes/mg órgano (x 10 <sup>6</sup> )	
		Bazo	Hígado
Control infección	1	0.381	47.6
	2	0.131	69.3
	3	0.058	79.8
	4	6.71	8.9
	5	2.09	52
	Media	1.87	51.4
	DS	2.52	27.14
2 mg/Kg	1	0.043	3.9
	2	0.058	1.1
	3	0.029	4.6
	4	0.0036	1.1
	5	0.080	4.6
	Media	0.042 *	3.82 *
	DS	0.025	0.59
40 mg/Kg	1	0.00011	0.039
	2	0.00025	0.0017
	4	0.0018	0.87
	5	0.00074	0.54
	Media	0.00072 *	0.362 *
	DS	0.00066	0.361

**Tabla 46:** Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de todos los lotes respecto al control de infección, tanto en bazo como en hígado.

	% REDUCCION DE LA CARGA PARASITARIA RESPECTO AL CONTROL INFECCION	
	BZ	HG
2 mg/Kg	97.75 *	92.56 *
40 mg/Kg	99.96 *	99.29 *

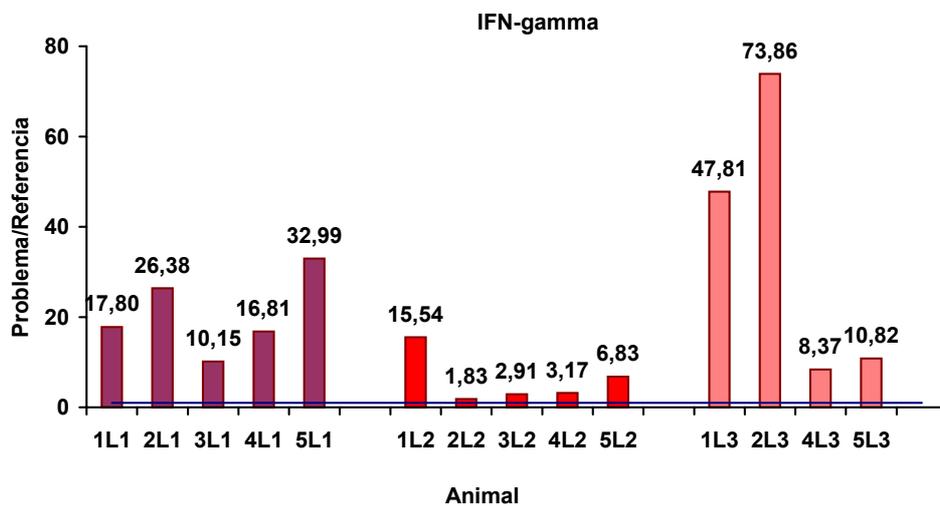
En ambos casos el porcentaje de reducción es muy elevado (\* p < 0.05), pero como era de esperar, en el lote tratado con la dosis de 40 mg/Kg/día la reducción es casi del 100% a día 3 p.t.

Resultados



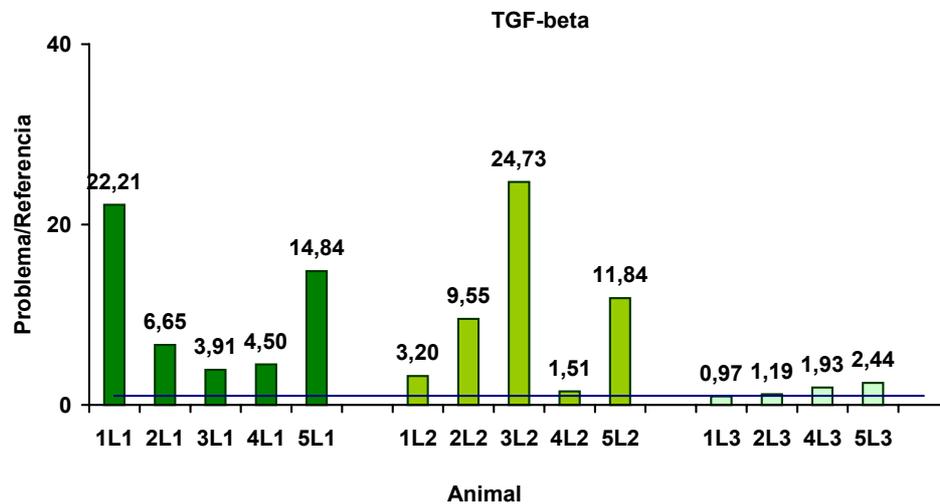
**Figura 50:** Grado de expresión de IL-4 en los lotes 1: Control de infección; 2: 2 mg/Kg/día y 3: 40 mg/Kg/día.

Parece existir una menor expresión de IL-4 en los dos lotes tratados con la anfotericina B formulada en HSA, excepto en el animal 4 del lote 3, que es el que presenta mayor carga parasitaria en bazo e hígado dentro de su lote.



**Figura 51:** Grado de expresión de IFN- $\gamma$  en los lotes 1: Control de infección; 2: 2 mg/Kg/día y 3: 40 mg/Kg/día.

En dos de los animales tratados con la dosis de 40 mg/Kg/día existe un alto grado de expresión de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, en el lote tratado con la dosis de 2 mg/Kg/día la expresión es menor que en los otros dos lotes.



**Figura 52:** Grado de expresión de TGF- $\beta$  en los lotes 1: Control de infección; 2: 2 mg/Kg/día y 3: 40 mg/Kg/día.

En el lote tratado con la dosis de 40 mg/Kg/día es en el que existe una menor expresión de TGF- $\beta$ , coincidiendo con su mayor eficacia.

### 9.1.3. Medida de la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos de cricetos no infectados y tratados con anfotericina B (apartado 7 de este capítulo).

Cricetos no infectados fueron tratados con 2 ó 40 mg/Kg peso/día de anfotericina B de referencia poliagregada encapsulada en microesferas de albúmina sérica humana y sacrificados el día 3 post-tratamiento.

Los resultados fueron los siguientes:

Resultados

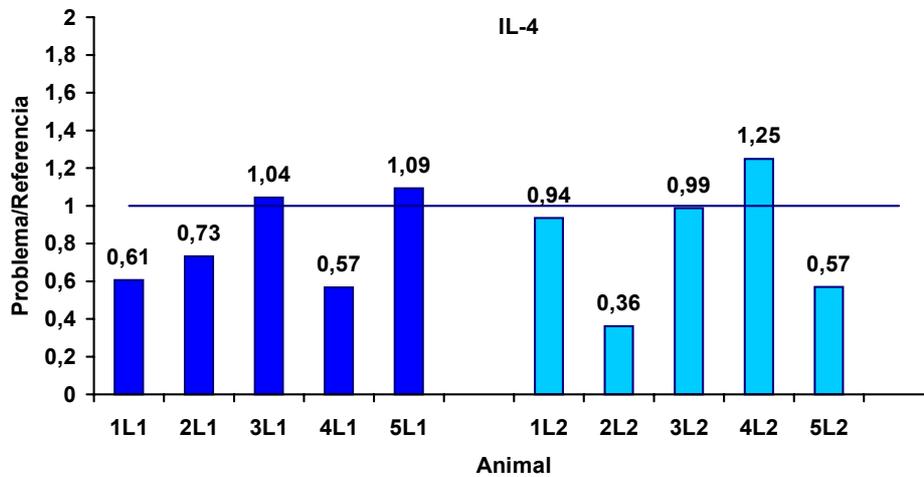


Figura 53: Grado de expresión de IL-4 en los lotes 1: 2 mg/Kg/día y 2: 40 mg/Kg/día.

Prácticamente no existe expresión de IL-4 en estos lotes.

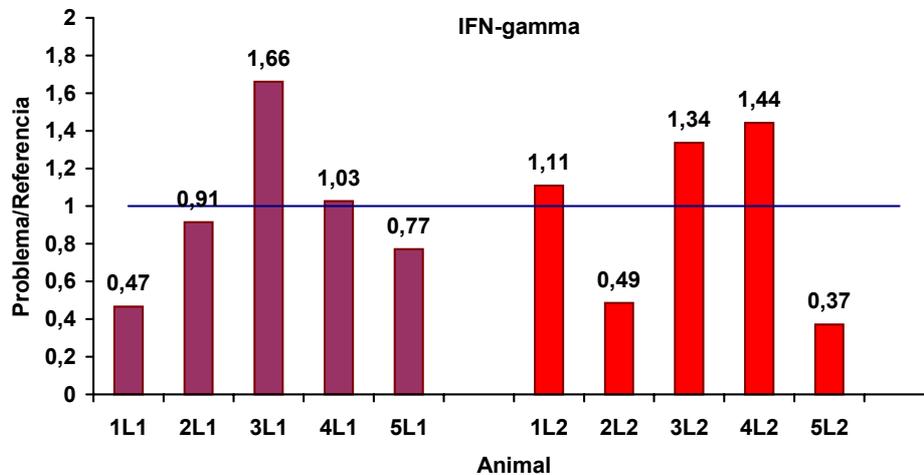
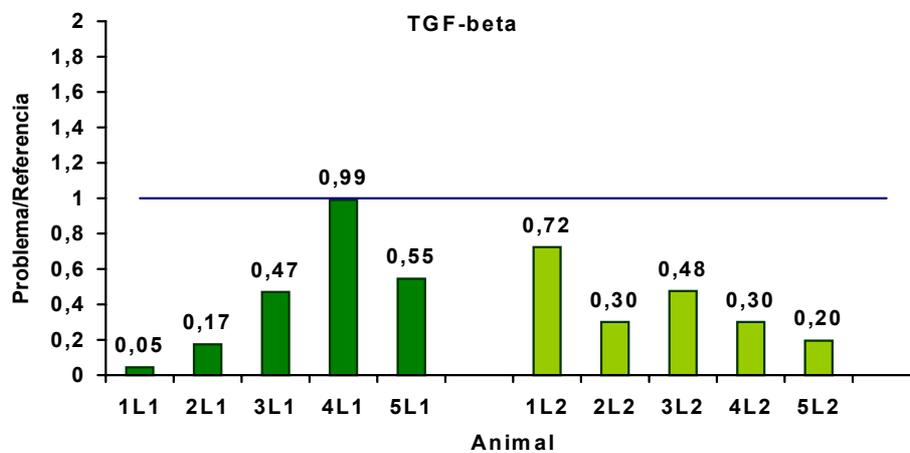


Figura 54: Grado de expresión de IFN- $\gamma$  en los lotes 1: 2 mg/Kg/día y 2: 40 mg/Kg/día.

En los casos en los que existe expresión de IFN- $\gamma$ , es muy baja por lo que podríamos considerarla despreciable.



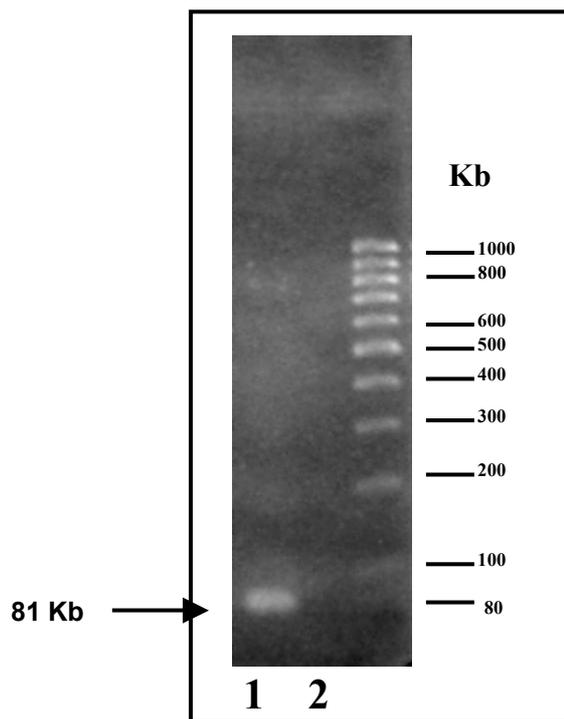
**Figura 55:** Grado de expresión de TGF- $\beta$  en los lotes 1: 2 mg/Kg/día y 2: 40 mg/Kg/día.

No existe expresión de TGF- $\beta$  en ningún caso. En la mayoría de los animales se aprecia una inhibición significativa (casi 5x respecto al valor de referencia).

## 9.2. Determinación de la carga parasitaria en bazo e hígado.

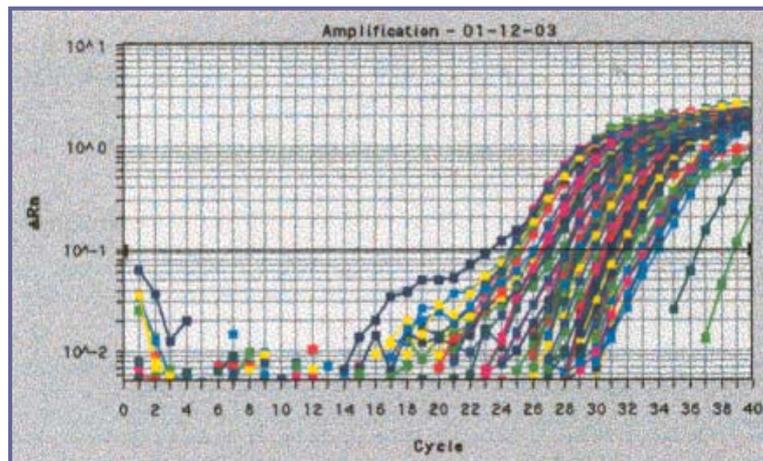
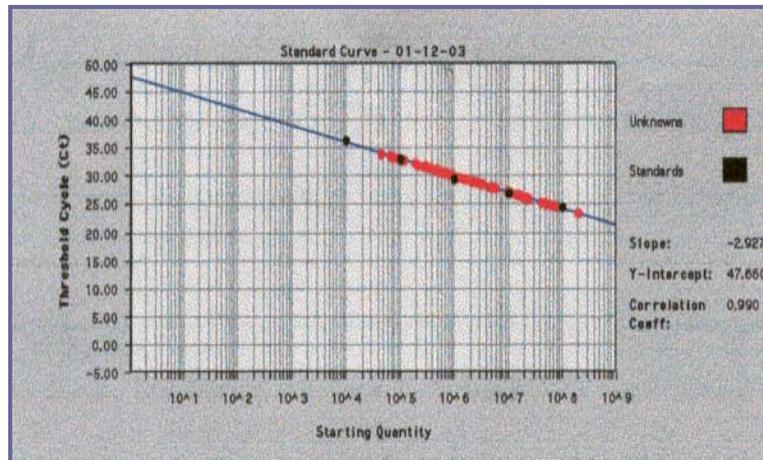
El fundamento de la técnica es el mismo que el explicado en el apartado anterior, pero en este caso solo fueron necesarios cebadores que amplificaran secuencias de DNA específicas de *L. infantum* y no fue necesario el paso de RT. Es decir, en esta ocasión la muestra empleada fue de DNA y no de cDNA. En el capítulo de Material y Métodos se detallan las condiciones de la técnica y el diseño de los cebadores (apartado 28).

También fue necesario poner a punto las condiciones de la PCR previamente, visualizando los productos de amplificación en geles de agarosa al 3%. Hay que destacar que no existían productos de amplificación cuando se realizaba la PCR con DNA de criceto.

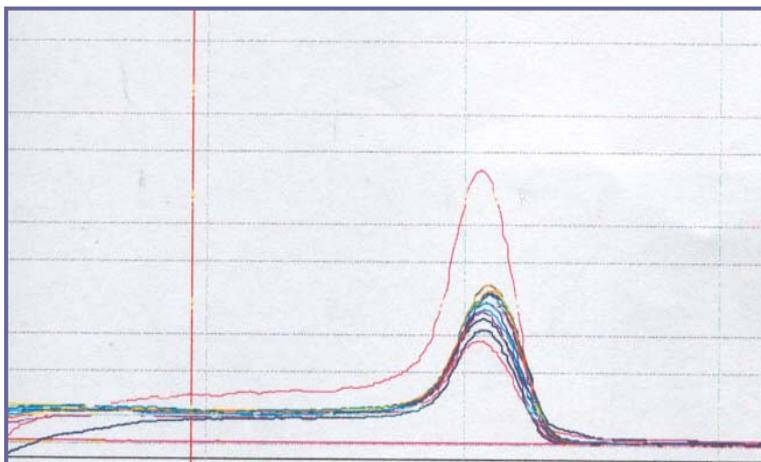


**Figura 56:** Gel de agarosa correspondiente a los productos de amplificación. **1:** ADN genómico de *L. infantum*. El producto de amplificación es de 81 Kb. **2:** ADN genómico de criceto.

A continuación se muestran ejemplos de la curva estándar de DNA genómico y de los ciclos de amplificación:



**Figuras 57 y 58:** Ejemplos de curva estándar de DNA genómico de *L. infantum* y de representación gráfica de los ciclos de amplificación. En la figura superior se observan varios puntos rojos que corresponden a las muestras problema que caen dentro de la curva estándar (puntos negros).



**Figura 59:** Curva de disociación. Efectivamente, existe un solo producto de amplificación.

## Resultados

En esta ocasión en vez de realizar una determinación de la expresión génica se realizó una cuantificación del número de parásitos y los cálculos se realizaron de una manera más sencilla.

**Tabla 47:** Ejemplo de resultados para el cálculo matemático. Cada muestra se analizó por duplicado pero en la tabla sólo mostramos un valor para simplificar.

	Pocillo	Ct de las muestras de ADN	Número de parásitos a partir de los que se extrajo el ADN	Log N° parásitos
<b>NTC</b>	<b>A1</b>	<b>40</b>	0	-
<b>Curva estándar</b>	<b>A2</b>	<b>12.68</b>	$10^7$	7
	<b>A3</b>	<b>16.27</b>	$10^6$	6
	<b>A4</b>	<b>19.63</b>	$10^5$	5
	<b>A5</b>	<b>23.70</b>	$10^4$	4
	<b>A6</b>	<b>26.91</b>	$10^3$	3
	<b>A7</b>	<b>30.63</b>	$10^2$	2
	<b>A8</b>	<b>34.22</b>	10	1
	<b>A9</b>	<b>37.81</b>	1	0
<b>Muestra problema</b>	<b>A10</b>	<b>13.82</b>	<b><u>4790780</u></b>	<b>6.68</b>

Se realizó la amplificación en una curva estándar con diluciones seriadas de DNA genómico de *L. infantum* con número de parásitos conocido (de  $10^7$  a 1) y se obtuvieron sus Cts. El número de parásitos en la muestra problema se obtuvo por interpolación de su Ct (13.82) en la recta obtenida a partir de los valores de Ct y del Logaritmo del número de parásitos de la curva estándar ( $y = a + bx \rightarrow Ct = 37.81 - 3.59(\text{Log N}^\circ \text{ parásitos})$ ; r: 0.99).

Las muestras de DNA problema se obtuvieron a partir de 20 mg de órgano y para realizar la amplificación se emplearon a la dilución 1/10. Así que, si el resultado obtenido para la muestra problema, después de haber interpolado su Ct en la curva estándar, es de 4790780 parásitos, hay que multiplicarlo por la dilución, o sea por 10, y luego dividirlo entre 20 mg para obtener el número de amastigotes por mg de órgano, en este caso  $2.39 \times 10^6$ .

Para comprobar la utilidad de esta técnica se realizó una cuantificación del número de parásitos en muestras de DNA obtenidas a partir de bazo e hígado de animales infectados con  $10^7$  promastigotes de la cepa BCN150 de *L. infantum* y sacrificados el día 135 p.i. (apartado 2.3 de este capítulo). Los resultados se compararon con los obtenidos mediante la técnica de la dilución límite y se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 48:** Comparación entre el recuento mediante la técnica de la dilución límite y el recuento mediante la nueva técnica de PCR cuantitativa a tiempo real.

Animal	DILUCION LIMITE		PCR CUANTITATIVA	
	Amastigotes/mg órgano ( $\times 10^6$ )		Amastigotes/mg órgano ( $\times 10^6$ )	
	Bazo	Hígado	Bazo	Hígado
1	0.074	0.030	2.39	0.204
2	2.56	1.22	3.63	0.792
3	6.09	0.011	0.58	0.190
4	0.465	0.028	1.04	0.131
<b>Media</b>	<b>2.297</b>	<b>0.322</b>	<b>1.91</b>	<b>0.329</b>
<b>DS</b>	<b>2.38</b>	<b>0.518</b>	<b>1.19</b>	<b>0.268</b>

Aunque existen diferencias a nivel individual, con ambas técnicas se obtienen valores medios similares.

Por lo tanto, la PCR cuantitativa resulta ser útil para la determinación de la carga parasitaria en órganos y ya está puesta a punto para su futura utilización en ensayos de eficacia de nuevos fármacos y formulaciones.

# ***Discusión***

## DISCUSION.

### 1. Modelo de leishmaniosis visceral en ratones Balb/c.

Se han desarrollado muchos modelos de leishmaniosis visceral con animales de laboratorio, cada uno con sus características, pero ninguno reproduce total o adecuadamente lo que ocurre en humanos y perros (Hommel y cols., 1995). Los factores que determinan el desarrollo clínico, son en parte, una característica del parásito, pero la naturaleza del hospedador, su constitución genética y su estado inmunitario juegan también un papel importante. Además de la naturaleza del hospedador, la principal diferencia entre las infecciones naturales y experimentales es, como ya hemos expuesto en la revisión bibliográfica, el inóculo del parásito. En condiciones naturales, el vector, deposita unos pocos cientos de promastigotes metacíclicos en la dermis del hospedador, mientras que las infecciones experimentales son normalmente inducidas por la inyección, subcutánea o intravenosa, de millones de promastigotes crecidos en cultivos axénicos *in vitro* o amastigotes obtenidos de lesiones cutáneas o bazos infectados.

En cada animal de laboratorio, el desarrollo de la infección, es decir, si la infección queda restringida al sitio de inoculación o si visceraliza, depende de una combinación de factores, como la especie de *Leishmania* inyectada, la virulencia del aislado de parásito, la naturaleza del inóculo y la vía de administración. La susceptibilidad o resistencia de cada especie animal esta controlada genéticamente, pero también es *Leishmania*-especie-específica, de hecho un hospedador puede ser susceptible a una especie y totalmente resistente a otra (Hommel y cols., 1995).

Las funciones, en el laboratorio, de los modelos animales experimentales de la leishmaniosis son: (1) el mantenimiento *in vivo* de cepas virulentas del parásito y la producción de amastigotes; (2) estudiar la patogénesis de la leishmaniosis y la inmunidad anti-*Leishmania*; (3) probar fármacos y vacunas frente a *Leishmania*.

En nuestro caso necesitábamos establecer un modelo de leishmaniosis visceral en el que, además de poder comprobar la eficacia de las distintas formulaciones galénicas, se pudiera también realizar un seguimiento inmunológico después del tratamiento farmacológico y en el que el comportamiento fuera similar al observado en

## Discusión

perros y humanos. A pesar de que ya habíamos encontrado en la bibliografía consultada que los ratones Balb/c son capaces de controlar la infección visceral desarrollando una inmunidad protectora frente a la infección (Leclerq y cols., 1996; Engwerda y cols., 1998; Honoré y cols., 1998), decidimos diseñar un experimento en el que comparar el comportamiento de animales infectados con distintas dosis de *L. infantum*, con la idea de que tal vez a dosis altas, con promastigotes de reciente aislamiento a partir de una cepa virulenta, la infección pudiera progresar, con expresión de signos clínicos (capítulo de Resultados, apartado 1.2). Para realizar dicha comparación, se determinaron el peso de los animales, las subclases de inmunoglobulinas, y los perfiles de reconocimiento antigénico a lo largo del experimento y también se determinaron la carga parasitaria, las subpoblaciones linfocitarias y se realizaron ensayos de linfoproliferación *in vitro* con linfocitos esplénicos obtenidos el día del sacrificio (147 p.i.).

En cuanto al peso de los animales (tabla 5), existió un ligero descenso a partir de la semana 13<sup>a</sup> p.i. con respecto al grupo de animales no infectados, pero posteriormente se produjo una recuperación, no existiendo diferencias entre los tres lotes infectados con las diferentes dosis de parásito a lo largo del experimento. Es decir, el peso no sería un buen parámetro para evaluar la eficacia de los fármacos. Lo que sí se observó fue esplenomegalia en todos los lotes infectados, siendo ésta mayor en el lote infectado con la dosis mayor.

La determinación de la carga parasitaria solo se realizó en el día del sacrificio (tabla 6), por lo que no sabemos como fue la evolución de la misma a lo largo del tiempo. Sin embargo, lo que sí podemos concluir es que a pesar de la variabilidad existente, de forma global, a medida que aumentaba la dosis de infección, se recuperaban más parásitos en bazo en el día del sacrificio, no existiendo parásitos en el hígado de ningún animal excepto en el animal 1 del lote infectado con la dosis mayor. Por lo tanto, se confirmó lo observado por otros autores que mostraron que la carga parasitaria primero aumentaba moderadamente para posteriormente disminuir (Leclerq y cols., 1996; Engwerda y cols., 1998; Honoré y cols., 1998), manteniendo un nivel bajo de infección crónica (Murray y cols., 1982; Wilson y cols., 1996). En concreto, Murray y cols. (1982) observaron que en ratones Balb/c infectados por vía intravenosa con  $10^7$  amastigotes de *L. donovani* existió una rápida proliferación del parásito en las primeras 4 semanas, pero a partir de la semana 8<sup>a</sup> p.i. los animales

fueron capaces de inhibir la replicación de los amastigotes y reducir la carga parasitaria en un 80%, estando esa resistencia correlacionada con la capacidad para generar linfoquinas activadoras de macrófagos. También se vio que ratones Balb/c, infectados por vía intracardiaca con  $2 \times 10^7$  amastigotes de *L. donovani*, mostraban un descenso de la carga parasitaria en hígado a partir del 2º mes p.i. e incremento progresivo en bazo (Mukherjee y cols., 2003). Así mismo, en ratones Balb/c infectados intravenosamente con un dosis alta de promastigotes de *L. infantum*, el número de parásitos en hígado disminuyó moderadamente a los 3-4 meses p.i., mientras que en el bazo aumentó, pero al emplear dosis de infección más bajas en muchos casos existió un total aclaramiento del parásito del hígado (Ahmed y cols., 2003); en el mismo trabajo se muestra que la infección con promastigotes por vía intradérmica produjo un aclaramiento del parásito en hígado y piel, con persistencia en bazo y nódulos linfáticos.

Aunque se determinaron la IgG1, IgG2a, IgG3 e IgM en todos los animales individualmente, solo mostramos los valores medios de cada lote ya que la respuesta fue muy baja o inexistente en casi todos los casos (figuras 9, 10, 11 y 12). Solamente para la IgG1 existió una correlación entre los niveles detectados mediante ELISA y la carga parasitaria recuperada en bazo. En el lote infectado con la dosis más alta, también existió un ligero aumento de la IgG2a en las últimas semanas, no existiendo respuesta en los otros dos lotes; para la IgG3 la respuesta fluctuó mucho a lo largo del tiempo, siendo solo detectable en el lote infectado con la dosis intermedia. En humanos aumentan los niveles de IgG, IgM e IgE durante la infección aguda (Anam y cols., 1999), sin embargo, en nuestro caso no encontramos respuesta por IgM en ningún caso.

Al igual que nosotros, Honoré y cols. (1998) observaron en ratones Balb/c infectados con  $10^7$  promastigotes de *L. infantum*, que la inmunoglobulina predominante era la IgG1, y que su cinética corría en paralelo con la de la IgG total, mientras que la IgG2a permaneció indetectable. Sin embargo, en el caso de los ratones C57BL/6 existió respuesta por ambas subclases de inmunoglobulinas. Por lo tanto, según esos autores en ratones Balb/c se estaría produciendo una respuesta Th2, mientras que en los C57BL/6 existiría una mezcla de Th1 y Th2. En nuestro caso, la respuesta por IgG1 comenzó a partir del tercer mes p.i., pero ellos detectaron respuesta a partir del mes y medio p.i. Estas diferencias podrían ser debidas a la mayor o menor virulencia

## Discusión

de la cepa de *L. infantum* empleada. El hecho de que no encontremos prácticamente respuesta por IgG1 en los lotes infectados con las dosis de  $10^6$  y  $10^5$  promastigotes podría deberse a una ausencia de activación de los linfocitos B a dosis bajas de infección.

Como hemos mencionado antes, las subpoblaciones linfocitarias (tabla 7) solo se determinaron en bazo en el día del sacrificio, por lo que no disponemos de datos de las mismas en sangre periférica y a lo largo del tiempo. La resistencia frente a *Leishmania* en infecciones en ratón se ha asociado a respuestas celulares en las que actuarían tanto los linfocitos CD4+ como los CD8+ (Stern y cols., 1988), y se ha visto que ratones Balb/c infectados con *L. donovani* poseen células T protectoras de fenotipo Ly-1+2+ y L3T4+ responsables del descenso de la carga parasitaria en estadios tardíos de la infección (Holaday y cols., 1988). Si lo comparamos con lo que ocurre en perros, al analizar subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica, existió un descenso progresivo de la población CD4+ (Moreno y cols., 1999) junto con aumento de los linfocitos CD28+, que son precursores de linfocitos B y por lo tanto causantes de la fuerte respuesta humoral canina (Slappendel, 1988).

Además del descenso en la subpoblación CD4+, en perros también se observó un descenso en las subpoblaciones CD21+, CD5+ y CD8+ en sangre periférica a medida que progresaba la enfermedad (Bourdoiseau y cols., 1997). En nuestro caso, a día 147 p.i. encontramos un ligero descenso de la subpoblación CD4+ en los lotes infectados con *L. infantum*, pero para la población CD8+ no existieron diferencias significativas con respecto al grupo sano, aunque no sabemos lo que ocurrió en estadios más tempranos. Lo que sí existió fue una correlación directa entre la subpoblación TCR $\beta$  y la dosis de infección e inversa entre la subpoblación TCR $\gamma\delta$  y la dosis de infección. Por otro lado, la baja respuesta humoral encontrada en nuestro caso sugiere que no deben haber existido grandes cambios en subpoblaciones encargadas de estimular a los linfocitos B productores de inmunoglobulinas.

Por último, los ensayos de linfoproliferación *in vitro* (tabla 8) mostraron que, tanto frente a los mitógenos, como frente al antígeno o a la asociación de ambos, existió una menor proliferación celular a medida que aumentaba la dosis de infección. En el caso de los perros existe una división entre perros asintomáticos o resistentes, que presentan anticuerpos negativos pero una respuesta proliferativa positiva de las

células frente a antígenos de *Leishmania* y, sintomáticos o susceptibles con anticuerpos positivos pero con células negativas (Cabral y cols., 1992; Cabral y cols., 1993; Pinelli y cols., 1994; Cabral y cols., 1998). En nuestro caso los animales infectados con la dosis más baja se asemejarían a los perros asintomáticos puesto que presentaban una respuesta linfoproliferativa más alta, tanto frente a los mitógenos como frente al antígeno, que los infectados con las dosis más altas, que se asemejarían a los sintomáticos.

Podemos deducir que el ratón Balb/c no sería un buen modelo de leishmaniosis visceral para nosotros por varias razones: a medida que la infección progresó, se produjo un aclaramiento de los parásitos en hígado por lo que el modelo solo sería útil para realizar cribados farmacológicos en estadios tempranos de la infección en los que aún existieran parásitos en los dos órganos. De hecho la mayoría de los cribados farmacológicos en ratones Balb/c infectados por *Leishmania*, se han realizado con dosis muy altas de parásito ( $10^7$ - $10^8$ ) y en estadios tempranos de la infección (Croft y cols., 1991; Gradoni y cols., 1993; Murray y cols., 1993; Buffet y cols., 1996; Mullen y cols., 1997; Petit y cols., 1999; Yardley y cols., 2000). Sin embargo, esta posibilidad no nos permitiría realizar un buen seguimiento inmunológico del efecto del tratamiento puesto que la respuesta humoral se produjo más tardíamente y fue muy baja en cualquier caso. Además, casi no existieron variaciones en el peso de los animales a medida que progresó la infección y los perfiles de reconocimiento antigénico aparecieron muy tardíamente y fueron muy débiles. Parece que solo los ensayos de linfoproliferación *in vitro* serían útiles al observarse una mayor proliferación celular con la disminución de la carga parasitaria, pero ese único parámetro no es suficiente para nuestros objetivos.

Por lo tanto, era necesario encontrar un modelo que se asemejara más al perro y al humano, en el que se produjera una alta colonización por parte del parásito en todos los órganos diana, con una alta activación policlonal de células B que indujera una gran producción de anticuerpos desde las primeras semanas p.i. y con otros signos similares como la disminución de peso, astenia, apatía, alteración estructural y funcional de los órganos afectados, degeneración de la piel, etc.

## 2. Modelo de leishmaniosis visceral en cricetos.

A lo largo de la revisión bibliográfica se ha puesto de manifiesto que el criceto dorado (*Mesocricetus auratus*) es un hospedador susceptible para el desarrollo de la infección por *L. donovani* y *L. infantum*, representando un buen modelo de leishmaniosis visceral (Ghosh y Ghosh, 1987; Binhazim y cols., 1993; Bories y cols., 1998; Ghose y cols., 1999; Requena y cols., 2000; Riça-capela y cols., 2003). Pero el empleo de este modelo se ha visto limitado por la ausencia de reactivo inmunológicos comerciales.

A pesar de la existencia de varios trabajos empleando este modelo, nuestro principal punto de referencia siempre ha sido el trabajo publicado por Requena y cols. en el año 2000. En dicho trabajo, se utilizaron 3 grupos de cricetos a los que les administraron  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  promastigotes/criceto de la cepa BCN150 de *L. infantum* (que es la misma empleada por nosotros) por vía intracardiaca, realizándose un seguimiento de los síntomas clínicos durante un año y determinándose la carga parasitaria en hígado y bazo en el momento del sacrificio.

La principal conclusión de ese trabajo fue que el criceto dorado representa un excelente modelo de leishmaniosis visceral debido principalmente a tres razones: la progresión de la infección y de la enfermedad puede seguirse a partir de un inóculo bajo ( $10^3$  promastigotes). En segundo lugar, los parámetros clínicos e inmunológicos sugieren que la leishmaniosis visceral en cricetos es comparable a la observada en perros y humanos y, en tercer lugar, un porcentaje de animales son capaces de resistir la infección mediante el desarrollo una respuesta inmune protectora espontánea, independientemente del inóculo empleado.

Además, de acuerdo con los síntomas clínicos, la inoculación de cricetos dorados con dosis de *L. infantum* que iban desde  $10^3$  a  $10^5$  promastigotes dio lugar a 2 tipos de infecciones: sintomática y asintomática. En el grupo de los sintomáticos, la aparición de la enfermedad dependía del tamaño de inóculo y estos animales presentaban signos severos de la enfermedad como deshidratación, astenia, hepatoesplenomegalia, alta carga parasitaria en hígado y bazo, fuerte respuesta humoral frente a los antígenos de *Leishmania* y altos niveles de anticuerpos en riñón. De acuerdo con los signos internos de la infección en los órganos diana, los animales

asintomáticos se dividieron en dos subgrupos: oligosintomáticos y claramente asintomáticos. El grupo oligosintomático estaba formado por aquellos animales que no presentaban ningún síntoma externo de la enfermedad pero mostraban esplenomegalia y cargas parasitarias moderadas en hígado y bazo, mientras que el grupo asintomático estaba formado por aquellos animales que no presentaban ningún síntoma, ni signo de enfermedad, con ausencia de inmunocomplejos en riñón. Entonces, estos animales habrían desarrollado una respuesta inmune protectora frente a la infección por *L. infantum*. Aunque en algunos de estos animales se detectaron amastigotes en hígado y/o bazo, estos autores apuntan a que su presencia no debe ser interpretada como un signo de infección activa.

En nuestro estudio, tratamos de adecuar las condiciones a nuestro objetivo de trabajo (valoración de nuevos tratamientos farmacológicos). Para ello, era necesario que la infección transcurriera con cierta rapidez, lo que requería el empleo de dosis infectantes más altas administradas por vía intracardiaca. Por ello, en un principio pensamos emplear una dosis de  $10^7$  promastigotes/criceto, al igual que habían hecho otros autores con el modelo murino (Croft y cols., 1991; Gradoni y cols., 1993; Murray y cols., 1993; Buffet y cols., 1996; Mullen y cols., 1997; Petit y cols., 1999; Yardley y cols., 2000). La lectura del trabajo de Requena y cols. (2000), nos planteó la duda de si a la dosis de  $10^7$  también pudiesen existir animales sintomáticos y asintomáticos. Esta situación supondría un inconveniente a la hora de realizar ensayos de eficacia terapéutica de fármacos, sobre todo en las primeras etapas del curso de la infección, ya que el desconocimiento *a priori* de la condición del animal (susceptible/resistente) podría alterar la valoración global de los resultados, porque si un animal no presentara carga, no podríamos diferenciar si había sido por la propia acción del fármaco o por que el animal hubiera desarrollado una infección autolimitante. Por lo tanto, dado que ellos habían estudiado las dosis de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$ , nosotros decidimos establecer un ensayo en el que se compararon las dosis de  $10^5$  y  $10^7$  promastigotes/criceto, para ver si con la dosis de  $10^7$  se conseguía una infección uniforme en todos los animales. La diferencia es que en nuestro caso realizamos un seguimiento de 4 meses y medio en vez de un año.

Con la dosis de  $10^7$  promastigotes, el peso de todos los animales del grupo disminuyó con respecto al lote infectado con la dosis de  $10^5$  y con respecto al grupo de los animales sanos, manteniéndose similar en estos dos últimos grupos; es decir, en el

## Discusión

lote infectado con la dosis mayor todos los animales mostraron pérdida de peso, astenia y empeoramiento del aspecto externo, por lo que podríamos considerarlos sintomáticos a todos (tabla 1). En el día del sacrificio existió esplenomegalia en los dos lotes infectados con *L. infantum*, pero el tamaño del hígado fue similar al de los animales sanos (tabla 2). A pesar de la gran variabilidad existente, existió una clara correlación entre la dosis de infección y la carga parasitaria recuperada en bazo e hígado en el día del sacrificio (tabla 2). Así, los animales infectados con la dosis mayor presentaron 100 veces y 1000 veces más parásitos en bazo e hígado respectivamente, que los infectados con la dosis menor.

En cuanto a los niveles de anticuerpos (figuras 1 y 2), encontramos una dinámica heterogénea sin correlación entre los niveles de IgG y la carga parasitaria dentro de un mismo grupo, es decir, el que un animal del grupo tuviera más carga parasitaria que otro no implicaba que tuviera mayor nivel de anticuerpos. Pero al comparar los dos grupos (figura 3), quedó claro que el lote infectado con la dosis mayor presentaba niveles de IgG mayores que el infectado con la dosis menor, con valores de densidad óptica que oscilaban entre 0.94 y 2.2 en la última semana del experimento, mientras que en el lote infectado con la dosis de  $10^5$ , los valores de densidad óptica variaban entre 0.17 y 1, en la última semana. Además, en el grupo infectado con el inóculo más pequeño, la respuesta por anticuerpos se empezó a detectar más tardíamente que en el infectado con el inóculo mayor. Esto coincidía con lo observado por Requena y cols. (2000) que encontraron una correlación entre el tamaño del inóculo y el momento en que se detectaba la respuesta humoral anti-*Leishmania*. Así, los cricetos infectados con  $10^5$  promastigotes mostraban anticuerpos anti-*Leishmania* al mes p.i., mientras que los sueros de los animales inoculados con  $10^4$  ó  $10^3$  promastigotes eran positivos solo después de 3 ó 4 meses, respectivamente. En su caso, la cinética de producción de anticuerpos también era muy heterogénea y la correlación entre el desarrollo de la enfermedad y la respuesta humoral no fue estadísticamente significativa, pero en aquellos animales en los que se mostraron claros síntomas de enfermedad, la respuesta humoral fue mayor que en aquellos que mostraron una infección autolimitante.

El principal inconveniente que la mayoría de los autores señalan a la hora de emplear la técnica de western-blot es la ausencia de estandarización, lo que hace la interpretación de las bandas específicas más difícil. En el caso de los cricetos, existen

muy pocos trabajos al respecto. Requena y cols. (2000) emplearon geles de acrilamida al 10% con antígeno de la cepa LEM75, obtenido mediante un tampón de lisis y sonicación, encontrando que la respuesta humoral estaba restringida a una serie de proteínas antigénicas, pero que no se incrementaba más allá de 5-7 meses en los cricetos sin síntomas de enfermedad. Por el contrario, la respuesta humoral en los animales que desarrollaron claros síntomas de leishmaniosis visceral mostró un incremento continuo en complejidad e intensidad de bandas durante el periodo post-infección verificando que, en animales sintomáticos y asintomáticos, era evidente la heterogeneidad en el patrón de reconocimiento antigénico.

En otros estudios que comparaban infecciones realizadas con  $10^5$  promastigotes o amastigotes de *L. infantum* por vía intraperitoneal (Riça-Capela y cols., 2003), en el mes de máxima carga en el grupo infectado con promastigotes (6<sup>o</sup> mes p.i.), aparecieron bandas de 31, 40-42, 47-50, 54-58, 63-69, 70-76, 80-88, 91-97, 100-107 y 110-118 KDa, mientras que en el mes de máxima carga en el grupo infectado con amastigotes (mes 5<sup>o</sup> p.i.) aparecieron las mismas bandas además de la de 21 KDa. Al final del experimento (8<sup>o</sup> mes p.i.) se detectaron bandas de bajo y medio pero no de alto peso molecular. El grupo infectado con promastigotes mostró predominancia de bandas de alto peso molecular, siendo la intensidad de las bandas mayor para el grupo infectado con amastigotes. Sin embargo, en general el patrón de reconocimiento fue heterogéneo y tampoco existió correlación entre los cambios en la carga parasitaria y el patrón de bandas obtenido.

Otros autores observaron bandas de 26, 35, 46, 59, 69, 107 y 120 KDa en geles al 10% en cricetos infectados con  $10^7$  amastigotes de *L. donovani* por vía intracardiaca (Evans y cols., 1990).

En nuestro caso (figuras 4, 5 y 6), al igual que Requena y cols. (2000) y que Riça-Capela y cols. (2003), también encontramos heterogeneidad en el perfil de reconocimiento antigénico, siendo dicho perfil más complejo en el lote infectado con más dosis. En general, aparecieron bandas de 16-18, 30, 32, 40, 42, 45, 50, 55, 60, 70, 80-90, 115, 125 y 150 KDa, teniendo en cuenta que no en todos los animales aparecieron las mismas bandas ni con la misma intensidad y que en el lote infectado con  $10^5$  promastigotes, dependiendo del animal, las bandas de 16-18, 30, 40, 45, 55, 60, 80-90, 115, 125 y 150 KDa se hicieron más débiles o desaparecieron a lo largo del

## **Discusión**

experimento, lo que coincidía con la menor respuesta por IgG determinada mediante ELISA. Parece que nuestro perfil se asemeja más al encontrado por Riça-Capela y cols. (2003), a pesar de que ellos realizaron la infección por vía intraperitoneal y nosotros por vía intracardiaca.

Al no haber realizado un seguimiento de la carga parasitaria a lo largo del tiempo no pudimos correlacionar la progresión de la infección con el número de proteínas inmunogénicas. Los autores anteriormente citados han mostrado que el número de éstas aumentaba con la progresión de la infección (Requena y cols., 2000), alcanzando el máximo en el momento de la máxima carga parasitaria (Riça-Capela y cols., 2003). Estos últimos autores mostraron, en general, que las primeras proteínas en detectarse eran las de bajo peso molecular, sugiriendo la asociación entre bandas de bajo peso molecular y estados moderados de infección. En nuestro caso, sin embargo, las primeras proteínas en aparecer eran las de rango intermedio (40-115 KDa), pero hay que tener en cuenta las posibles diferencias existentes debido al empleo de distintos antígenos o protocolos de trabajo.

Al analizar las subpoblaciones linfocitarias CD4+, CD8+, CD19, etc, con anticuerpos de ratón, el único que presentó reacción cruzada con criceto fue el anti-CD4+. El hecho de poder realizar solo un marcaje planteó una serie de inconvenientes: en primer lugar era una cuantificación relativa, porque al no poder medir la población CD8+ o la de linfocitos totales los resultados no se pudieron expresar en términos absolutos. Además, al no haber sido posible realizar el doble marcaje CD4+/CD8+ con dos fluorocromos distintos, fue más difícil seleccionar la población a analizar. De todas formas al ser una cuantificación relativa, en el caso de que hubiéramos cometido algún error al seleccionar la población, ese error habría sido siempre el mismo (error sistemático) y eso no impidió establecer una comparación entre los distintos lotes.

Al emplear las dosis de infección de  $10^5$  y  $10^7$  promastigotes, encontramos una mayor proporción de las células CD4+ en bazo en el lote infectado con la dosis mayor en el día del sacrificio (tabla 3). Esto no concuerda con lo observado en perro, ya que en animales infectados experimentalmente, hacia el 6°-8° mes p.i. se produce un descenso significativo en dicha población en sangre periférica, coincidiendo con el comienzo de la aparición de los síntomas (Moreno y cols., 1999). Nosotros no

realizamos una dinámica de esta población, por lo que no sabemos lo que ocurrió en estadios más tempranos, ni lo que hubiera ocurrido si hubiéramos sacrificado a los animales más tardíamente. Además, al no disponer de datos sobre otras poblaciones linfocitarias, fue más difícil sacar conclusiones respecto a este parámetro. Así mismo, realizamos la prueba en bazo mientras que en perros y humanos se realiza en sangre periférica. Podría ser que en el modelo de criceto la población celular CD4+ no fuera determinante en la susceptibilidad, sino otras subpoblaciones. En cualquier caso, decidimos determinar este parámetro en los demás estudios de eficacia farmacológica, con el fin de estudiar el efecto de nuestras formulaciones sobre dicha población. Más adelante, se discutirán con más detalle las variaciones ocurridas en esta subpoblación linfocitaria en los animales infectados y tratados, comparándose con los resultados obtenidos por otros autores.

Los ensayos de linfoproliferación celular (tabla 4) muestran que en los dos lotes infectados con *L. infantum* se produjo un descenso en la proliferación celular frente a concanavalina A y frente a los antígenos con respecto al grupo de los animales sanos. Esto concuerda con lo observado en perros sintomáticos (Cabral y cols., 1992; Cabral y cols., 1993; Pinelli y cols., 1994; Cabral y cols., 1998). Nosotros encontramos variabilidad individual pero por regla general, existió una mayor respuesta linfoproliferativa en los animales infectados con la dosis menor. Sin embargo, no encontramos correlación entre la carga parasitaria y la respuesta proliferativa a nivel individual, y la respuesta frente a los antígenos estuvo totalmente inhibida. Cuando comentemos los datos de los animales tratados farmacológicamente, discutiremos este parámetro con más profundidad.

Por lo tanto, aplicando la dosis de  $10^7$ , todos los animales alcanzaron el período sintomático, con cargas parasitarias altas, tanto en hígado como en bazo, marcada esplenomegalia, disminución de peso, aumento progresivo de IgG desde las primeras semanas e inhibición de la respuesta linfoproliferativa.

### **3. Efecto del tratamiento sobre la carga parasitaria: eficacia de las nuevas formulaciones.**

En la actualidad, los antimoniales pentavalentes continúan siendo el fármaco de elección para el tratamiento la leishmaniosis visceral en todas las regiones del

## Discusión

mundo, excepto en la India, debido a la aparición de resistencias. Sin embargo, la situación ha cambiado y desde 1990 numerosos esfuerzos han dado lugar al redescubrimiento de fármacos de segunda elección, lo que ha posibilitado la realización de tratamientos más cortos, probándose combinaciones de fármacos, incluyendo la inmunoterapia o la identificación de agentes orales. Por ello, hoy en día encontramos además de los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y sus formulaciones lipídicas, la aminosidina, los antimoniales combinados con aminosidina o con IFN- $\gamma$  y la miltefosina (Murray, 2000).

En la zona Mediterránea, la OMS admitió, en 1995, cuatro regímenes aceptables para el tratamiento de la leishmaniosis visceral en pacientes inmunocompetentes (Gradoni y cols., 1995): Antimoniales pentavalentes a la dosis de 20 mg/Kg/día durante 28 días; una combinación de antimoniales (20 mg/Kg/día) y de alopurinol (15 mg/Kg/día) durante 20-28 días; AmBisome<sup>®</sup> a la dosis de 3 mg/Kg/día en los días 0, 1, 2, 3, 4 y 10, alcanzándose una dosis total de 18 mg/Kg; y por último, aminosidina, cuya dosis y duración del tratamiento no esta bien definida, aunque se usa sola o en combinación con antimoniales pentavalentes a la dosis de 12-16 mg/Kg durante 14-63 días.

En la leishmaniosis canina de entre todos los protocolos estudiados, los más destacados han sido: el Glucantime<sup>®</sup> a la dosis de 100 mg/Kg/día durante 3-4 días (Valladares y cols., 1996; Slappendel y Teske, 1997); Zyloric<sup>®</sup> a la dosis de 20 mg/Kg/día continuamente (Slappendel y Teske, 1999) o a la dosis de 15 mg/Kg dos veces al día en combinación con 100 mg/Kg de antimonio de meglumine (Denerolle y Bourdoiseau, 1999); Fungizona<sup>®</sup> a la dosis de 0.5-0.8 mg/Kg 2-3 veces hasta alcanzar una dosis total de 15 mg/Kg (Lamothe, 1997), o a la dosis de 1-2.5 mg/Kg mezclada en emulsiones lipídicas dos veces a la semana hasta alcanzar una dosis de 10 mg/Kg (Lamothe, 2001) y por último, AmBisome<sup>®</sup> a la dosis de 3 mg/Kg/día hasta alcanzar un dosis total de 15 mg/Kg (Oliva y cols., 1995). Sin embargo, aunque estas terapias consiguen mejorías clínicas temporales y cambios en los parámetros inmunológicos, normalmente no impiden las recaídas y no eliminan por completo la presencia del parásito. Por lo tanto, dado que la leishmaniosis canina representa un grave problema de salud pública en la zona Mediterránea, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas a los tratamientos ya existentes para conseguir una cura parasitológica consistente.

Decidimos centrarnos en la anfotericina B, buscando nuevas formulaciones para su encapsulación que aumentaran su eficacia, reduciendo su toxicidad y, a ser posible más económicas, ya que las formulaciones lipídicas son muy caras, lo que limita su uso en humanos que habitan en países en desarrollo y también en perros.

Como hemos visto a lo largo de la revisión bibliográfica, han sido muy numerosas las pautas de tratamiento ensayadas, tanto con anfotericina B desoxicolato, como con sus formas lipídicas, en pacientes de la India y de otras partes del mundo, incluyendo la zona mediterránea, y también en perros afectados de leishmaniosis visceral y en modelos de experimentación animal como ratones y cricetos. Así, en la India se obtuvo un 98 % de curación con anfotericina B desoxicolato (Mishra y cols., 1992; Thakur y cols., 1999). Sin embargo, los efectos adversos como fiebre, dolor óseo y toxicidad renal son problemas muy importantes.

Por otro lado, las formulaciones lipídicas de anfotericina B han demostrado ser más eficaces y limitar la toxicidad de la anfotericina B convencional (Dietze y cols., 1995; Davidson y cols., 1996; Sundar y cols., 1996). Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes: por ejemplo, AmBisome<sup>®</sup> es activo en cursos de terapia cortos y ocasiona pocas reacciones adversas, pero su uso en regiones endémicas distintas de Mediterráneo es prohibitivo por el coste, estando también limitado su uso en perros por la misma razón. Abelcet<sup>®</sup> y las emulsiones grasas de anfotericina B, aunque en menor grado que la anfotericina B convencional, también producen fiebre, escalofríos y nefrotoxicidad. Amphocil<sup>®</sup> podría ser útil en cursos de terapia cortos, pero no ha sido suficientemente estudiado. La comparación del coste sugiere que las emulsiones grasas de anfotericina B presentan una mejor relación coste-eficacia, sin embargo, solo se han ensayado en la India y existe controversia respecto a su empleo (Murray, 2000). Si consideramos la posología y la duración de la terapia indicados en el Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, los costes medios de los tratamientos con anfotericina B son entre 10 y 50 veces más caros con las formulaciones lipídicas que con la Fungizona<sup>®</sup>. Por eso, es necesario el desarrollo de nuevas terapias que aporten una mejor relación beneficio/riesgo, así como una mejor relación beneficio/coste.

Como alternativa a todo esto decidimos probar nuevas formulaciones para la inclusión de anfotericina B, siendo la primera de ellas la elaborada con **albúmina sérica humana (HSA)**. Las proteínas de albúmina están presentes en varias especies

## **Discusión**

animales y al desnaturalizarse forman una estructura tridimensional capaz de albergar otras sustancias en su interior. La albúmina se considera una buena candidata para la microencapsulación de fármacos porque es biocompatible, ya que es la principal proteína de la sangre en mamíferos (Lehninger y cols., 1993), es biodegradable (Luftensteiner y Viernstein, 1998), y existen trabajos previos en los que se ha empleado para la fabricación de microesferas conteniendo nicardipina o dexametasona mediante atomización (Conte y cols., 1994; Pavanetto y cols., 1994), proporcionando una elevada eficiencia de encapsulación y mayor estabilidad que los liposomas (D'Souza y cols., 1999). En concreto, la albúmina sérica humana está comercializada en soluciones de distinta concentración y se emplea en síndromes hipovolémicos y en hipoproteinemias.

En el **primer ensayo con la anfotericina B** (capítulo de Resultados, apartado 2), empleamos la anfotericina B de referencia en estado de agregación dimérico, que es considerada un símil de la anfotericina B desoxicolato comercial (Fungizona<sup>®</sup>). Se comenzó con la dosis de 1 mg/Kg/día porque es la que se suele emplear habitualmente en terapéutica para la Fungizona<sup>®</sup>, estableciéndose una comparación entre la anfotericina B dimérica libre y encapsulada en microesferas de albúmina sérica humana.

Con una pauta de tratamiento en la fase temprana de la infección (días 25, 27 y 29 p.i.), es decir una dosis total de 3 mg/Kg peso, existió una clara disminución del número de parásitos, tanto en hígado como en bazo, al emplear la nueva formulación de HSA, con porcentajes de reducción en bazo e hígado de 87,25 y 88,82 % respectivamente, frente al 11,11 y 53,65 % obtenidos con la anfotericina B de referencia sin encapsular (tablas 9 y 10). Pero a día 135 p.i. (tablas 13 y 14) se produjo una recuperación parcial de la infección con respecto al día 32 p.i. (53,97 y 66,72 % de reducción en bazo e hígado, respectivamente, con la nueva formulación, frente al 32,24 y 17,17 % en bazo e hígado, respectivamente, con la anfotericina B libre).

En definitiva, en nuestro modelo esta pauta de tratamiento triple en la fase temprana no parecía ser adecuada; sería necesario quizás el empleo de dosis más altas o una duración más larga del tratamiento. Sin embargo, en ratones Balb/c afectados de leishmaniosis visceral, AmBisome<sup>®</sup> mostró una eficacia mayor cuando se administró en la fase aguda, que cuando se hizo en la fase crónica de la enfermedad

(Gangneux y cols., 1996). Hay que tener en cuenta que en nuestro caso al final del experimento solo sobrevivió un animal de los tratados con la anfotericina B dimérica libre y sin embargo, en el lote tratado con la nueva formulación sobrevivieron todos, demostrándose así su ventaja sobre el empleo de la forma libre. Es importante destacar que las microesferas de albúmina sérica humana vacías no ejercieron ningún efecto en el desarrollo de la infección (apartado 2.3 de Resultados).

En el **siguiente experimento** (apartado 3) decidimos cambiar el planteamiento de trabajo. En primer lugar, aumentamos la dosis de anfotericina B de referencia al doble, empleando una pauta de tratamiento triple en los días 69, 71 y 73 p.i. (dosis total de 6 mg/Kg peso), una vez comprobado que todos los animales alcanzaban el periodo sintomático, mediante la determinación de los niveles de IgG en las semanas 7<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> p.i. (niveles de entre 0.3 y 0.4 de D.O.) y mediante la valoración del aspecto externo y los síntomas. Así mismo, se estudió la influencia de los distintos estados de agregación de la molécula.

Existen trabajos que muestran que el estado de agregación influye en la toxicidad (Bolard y cols., 1991; Barwicz y cols., 1992; Legrand y cols., 1992) y en la actividad de la anfotericina B (Gruda y cols., 1980; Ramos y cols., 1989; Lambing y cols., 1993) y por todo ello, decidimos ensayar los tres estados de agregación existentes, en comparación con la anfotericina B de referencia dimérica libre. El que la molécula adopte un estado de agregación u otro depende del medio en el que se encuentra dispersada (Gruda y cols., 1980, Mazerski y cols., 1990; Balkrishnan y Easwaran, 1993), la concentración de anfotericina B (Mazerski y cols., 1990; Tancredi y cols., 1990; Balkrishnan y Easwaran, 1993) o por ejemplo, la temperatura a la que la anfotericina B ha sido sometida (Lambing y cols., 1993; Gaboriau y cols., 1997; Petit y cols., 1999).

En nuestro caso, la forma monomérica fue la menos eficaz de todas, incluso menos que la forma dimérica libre. Además, las formas dimérica y poliagregada encapsulada fueron más eficaces que la forma dimérica libre, por lo que el encapsulamiento de albúmina demostró ser ventajoso de nuevo (tablas 23 y 24). A igualdad de eficacia de las formas dimérica y poliagregada encapsuladas, la forma poliagregada era mejor porque era menos tóxica. Esto se demostró porque en el lote

## **Discusión**

tratado con la formulación dimérica murieron 2 animales durante la semana del tratamiento, confirmándose posteriormente en los estudios de toxicidad (apartado 4).

En el **tercer estudio** (apartado 5 de Resultados), continuando con la pauta de tratamiento en el periodo sintomático de la enfermedad, nos aventuramos a emplear una dosis de anfotericina B de referencia en estado poliagregado muy alta, la máxima dosis encapsulable en albúmina sérica humana que no producía toxicidad (ensayos de toxicidad aguda, apartado 4): 40 mg/Kg/día (dosis total de 120 mg/Kg peso).

Queda claro que a la dosis de 40 mg/Kg/día, la formulación de HSA conteniendo anfotericina B de referencia en estado poliagregado consiguió aclarar totalmente los parásitos en el bazo de todos los animales y en el hígado de tres de ellos, es decir, se consiguió la cura parasitológica en la mitad del lote (tablas 30 y 31). Esto supuso un logro de gran valor y confirmó la importancia del estado de agregación de la molécula, ya que dicho aclaramiento se logró sin ningún síntoma de toxicidad en ningún animal. Los estudios de toxicidad (apartado 4) mostraron que la máxima dosis de anfotericina B de referencia dimérica encapsulada o no, que se podía administrar en animales enfermos era de 2.5 mg/Kg. Con esas dosis, ya hemos visto que no se consiguieron eficacias tan altas como con la forma poliagregada a la dosis de 40 mg/Kg peso, por lo que en los siguientes experimentos decidimos seguir empleando solo este último estado de agregación.

Teniendo en cuenta que la formulación de HSA, conteniendo anfotericina B poliagregada a la dosis de 40 mg/Kg era tan eficaz, decidimos diseñar un experimento en el que comparar la forma poliagregada libre y encapsulada en HSA a **dosis intermedias entre la de 2 y la de 40 mg/Kg peso**, para estudiar si a dosis más bajas de 40 mg/Kg también se conseguía un 100% de reducción de la carga y para confirmar las ventajas del uso de la formulación de HSA. Las dosis ensayadas fueron las de 10 y 20 mg/Kg peso/día, de nuevo en el periodo sintomático de la enfermedad (dosis totales de 30 y 60 mg/Kg peso) (apartado 6 de Resultados). Los resultados muestran que con ambas dosis se consiguió una alta reducción de la carga parasitaria de forma bastante homogénea en todos los animales, siendo la eficacia similar, del 99%, en todos los lotes, es decir, no existían diferencias entre la forma libre y encapsulada al emplear este estado de agregación (tablas 35 y 36).

En definitiva, la formación de las microesferas no mejoró la eficacia, pero sí la toxicidad aguda porque en los animales tratados con 10 mg/Kg de anfotericina B poliagregada libre se produjo una alteración en el comportamiento, de manera que durante unos pocos minutos permanecieron más inactivos, y a la dosis de 20 mg/Kg/día de la forma libre ocurrió lo mismo y además murieron la mitad de los animales. Esto confirmó nuestra teoría sobre las ventajas del encapsulamiento con HSA, ya que en el lote tratado con la anfotericina B poliagregada formulada en HSA a la dosis de 20 mg/Kg peso/día no murió ningún animal. Por lo tanto, al ser similar la eficacia pero menor la toxicidad, la formulación de HSA mejora la relación entre ellas. No se han realizado ensayos de toxicidad con la dosis de 40 mg/Kg de la forma poliagregada libre, pero teniendo en cuenta la mayor toxicidad de esta forma a la dosis de 20 mg/Kg era de esperar que ésta fuera claramente superior.

Por lo tanto, de todos los ensayos realizados con las microesferas de HSA podemos deducir que, a igual dosis de fármaco (2 mg/Kg/día), la anfotericina B monomérica formulada en HSA es menos eficaz que la anfotericina B dimérica tanto libre como formulada en HSA. La anfotericina B dimérica formulada en HSA es más eficaz que la libre, pero esto no ocurre cuando el fármaco está en estado poliagregado, ya que a igual dosis (10 y 20 mg/Kg/día) la eficacia es similar para la libre y la formulada. Sin embargo, la anfotericina B poliagregada formulada en HSA es menos tóxica que la libre y que los otros estados de agregación, con lo cual el margen terapéutico aumenta considerablemente ofreciendo la posibilidad de una utilización más segura del fármaco a dosis totales más elevadas (de hasta 40 mg/Kg/día), que permitirían la curación parasitológica.

También hay que destacar algo muy importante y es que las microesferas de HSA vacías no presentaron ninguna actividad *per se*, ni a nivel de eficacia ni a nivel inmunológico, al emplearse en el periodo sintomático (apartado 5, tablas 30 y 31), a pesar de haberse ensayado a una cantidad mayor que cuando se hizo en la fase temprana de la infección.

Los polímeros de **ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)** son reconocidos rápidamente por el sistema fagocítico mononuclear cuando se inyectan por vía intravenosa (Allémann y cols., 1998; Walter y cols., 2001). Como *Leishmania* se hospeda principalmente en macrófagos de bazo e hígado, el uso de estos polímeros

## **Discusión**

parecía prometedor. Además, son biocompatibles (Walter y cols., 2001), biodegradables (Allémann y cols., 1998) y existen especialidades farmacéuticas de administración parenteral como el Decapeptyl® (Ipsen Pharma). La diferencia entre el Resomer® RG-502 y el Resomer® RG-503 es el peso molecular y la viscosidad intrínseca. De entre los dos el más eficaz fue el Resomer® RG-502, con porcentajes de reducción del 72.92 y 71.38 % en bazo e hígado, respectivamente, frente al 67.62 y 26.1% obtenidos con el Resomer® RG-503 (tablas 42 y 43). Por lo tanto, no se llegaron a alcanzar las altas eficacias conseguidas con HSA. En algunos animales no encontramos reducción de la carga parasitaria en este momento del sacrificio, aunque no sabemos qué había ocurrido en estadios más tempranos. Además, con estos polímeros murieron varios animales, por lo que pudiera existir un efecto tóxico en esta especie animal, aunque no se han hecho estudios en animales sanos para confirmarlo.

En este mismo ensayo con los polilactatos, se decidió incluir un lote tratado con **Fungizona**® a la dosis de 2 mg/Kg/día. Pero la Fungizona® no consiguió reducir la carga parasitaria en ningún animal, si no que al contrario de lo esperado, existió más carga en ese lote que en el control de infección en ese momento del sacrificio. Una explicación podría ser que el tratamiento con este medicamento duró mucho menos de lo recomendado habitualmente, pues se limitó solo a tres inyecciones.

En resumen, de las formulaciones empleadas, las de HSA han sido claramente superiores a las de PLGA. De entre las formulaciones de HSA la mejor fue la que contenía anfotericina B en estado poliagregado, permitiendo la administración de dosis muy altas de fármaco, sin toxicidad aguda. Además, no se podría aplicar la misma dosis (40 mg/Kg peso) con otros polímeros puesto que su dispersibilidad era peor.

Una ventaja importantísima de la formulación de HSA es que es fácil de preparar, estable y muchísimo más económica que los liposomas convencionales. Esto supondría una mayor accesibilidad para el tratamiento de la leishmaniosis canina. Falta por confirmar la ausencia de recaídas en criceto, de hecho se dispone de un lote de animales tratados con la formulación de HSA a la dosis de 40 mg/Kg/día (dosis total de 120 mg/Kg peso) que a día de hoy (9 meses después del tratamiento) no presenta síntomas aparentes de enfermedad y que pretendemos sacrificar después de un largo periodo de tiempo para confirmar la cura parasitológica. Además, los primeros ensayos realizados en perros en colaboración con el Departamento de Patología

Animal I de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, están dando buenos resultados, habiéndose obtenido ya la patente de la nueva formulación (Nº de Registro: 200300089).

También se realizaron estudios de farmacocinética en colaboración con el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica, con las formas dimérica y poliagregada libres y con la forma poliagregada formulada en HSA. Los resultados de dichos estudios forman parte de la Tesis Doctoral de D. José Antonio Sánchez Brunete (2003), y de ellos se deduce que la menor toxicidad de la forma poliagregada podía ser debida a que permaneció en suero en concentraciones elevadas durante menos tiempo que la forma dimérica y que la menor toxicidad de las microesferas podía ser debida a que se aclaró más rápidamente desde sangre a tejidos que la anfotericina B libre. De hecho, AmBisome® y otras formulaciones de anfotericina B también se acumulan más en los órganos dianas que la forma libre (Croft y cols., 1991; Gradoni y cols., 1993; Gangneux y cols., 1996; Paul y cols., 1997).

Además, nuestra nueva formulación consiguió eficacias más altas que otras que se han probado frente a la leishmaniosis visceral. Por ejemplo, nuevas formulaciones lipídicas de anfotericina B constituidas por péptidos activadores de macrófagos, mostraron un 79 % de reducción en bazo frente al 69 % conseguido con los liposomas convencionales a los 15 días post-tratamiento, al emplear una dosis única de 1 mg/Kg peso (Agrawal y cols., 2002), por lo tanto, nuestra formulación de albúmina con anfotericina B en estado poliagregado parece ser mejor, ya que se consiguió casi un 100 % de reducción. Por otro lado, las formulaciones realizadas con surfactantes no iónicos fueron menos eficaces que los liposomas convencionales en la fase aguda de la enfermedad, cuando contenían anfotericina B como principio activo (Mullen y cols., 1997); en este trabajo los autores señalan que el estado de agregación en las formulaciones era mayoritariamente poliagregado y monomérico. La misma formulación fue más eficaz que los liposomas cuando contenía estibogluconato de sodio como principio activo (Mullen y cols., 1998).

Otras formulaciones lipídicas mostraron una eficacia 3 veces mayor que la Fungizona® cuando se ensayaron dosis de entre 0.05 y 3 mg/Kg peso, en la fase aguda de la enfermedad (Paul y cols., 1997), mientras que las diseñadas con un biovector anfifílico, mostraron eficacia similar al AmBisome® al emplearse en dosis

única de 0.5 ó 25 mg/Kg peso (Loiseau y cols., 2002). El empleo de anfotericina B conjugada con arabinogalactano, que es un polisacárido natural, sobre todo en su forma reducida, consiguió una mayor eficacia que la Fungizona<sup>®</sup> y que el AmBisome<sup>®</sup> en ratones Balb/c infectados con *L. major* (Golenser y cols., 1999); faltaría por ver si presenta la misma eficacia frente a la leishmaniosis visceral. La asociación de anfotericina B con otros lípidos como dimiristol fosfatidilcolina y dimiristol fosfatidilglicerol fue menos eficaz que el AmBisome<sup>®</sup> frente a *L. donovani in vivo* (Larabi y cols., 2003). Por otro lado, el primer intento de administración de anfotericina B por vía oral en forma de nanosuspensión solo proporcionó una eficacia del 28.6 % en ratones Balb/c (Kayser y cols., 2003).

## **4. Efecto del tratamiento sobre la respuesta inmune.**

### **4.1. Respuesta inmune humoral.**

En la mayoría de los casos existentes en la bibliografía, al aplicar los tratamientos farmacológicos se produjo una recuperación de la respuesta inmune celular y un descenso en los niveles de anticuerpos. Así por ejemplo, en perros infectados experimentalmente con *L. infantum* y tratados con Glucantime<sup>®</sup> se produjo un descenso en los niveles de anticuerpos, aunque seguían existiendo parásitos en los ganglios poplíteos (Riera y cols., 1999), y en perros tratados con anfotericina B convencional, se produjo una curación clínica del 93 %, con disminución de los niveles de anticuerpos específicos después del tratamiento (Lamothe, 1997). Al emplear otros fármacos como el alopurinol en perros infectados naturalmente, disminuyeron la IgG1 y la IgG2 después del tratamiento, pero con predominio de la IgG2 (Vercammen y cols., 2002), y los perros respondedores al tratamiento con antimoniales y alopurinol presentaron baja reactividad por IgG1 e IgG2, sobre todo frente al antígeno de 67 KDa (Fernández-Pérez y cols., 2003). En perros infectados naturalmente con enfermedad patente y tratados farmacológicamente, la IgG disminuyó más en los respondedores, siendo este descenso mayor para la IgG1 que para la IgG2. (Solano-Gallego y cols., 2001).

En nuestro caso observamos que, en términos generales, con la anfotericina B de referencia en estado dimérico libre no se produjo descenso en los niveles de anticuerpos con ninguna de las dos dosis empleadas (1 ó 2 mg/Kg/día), tanto en la

fase temprana, como en el periodo sintomático de la enfermedad (apartados 2 y 3, figuras 14, 15, 16, 22 y 23). Otros autores tampoco observaron descenso en los niveles de anticuerpos después del tratamiento de cricetos o perros con anfotericina B liposomal (Bories y cols., 1998; Oliva y cols., 1995; Lamothe, 2001) o con antimoniales (Guarga y cols., 2002), sugiriéndose que los anticuerpos no podrían ser usados como parámetro para valorar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, a la dosis de 1 mg/Kg/día de anfotericina B dimérica formulada en HSA se produjo un descenso o estabilización de la IgG en la fase temprana de la infección (apartado 2, figuras 15 y 16), y con la anfotericina B en estado dimérico a la dosis de 2 mg/Kg/día formulada en HSA, existió un ligero descenso después del tratamiento, con mantenimiento posterior cuando se administró en el periodo sintomático de la enfermedad (apartados 3, figuras 22 y 23).

Aunque empleando la formulación de HSA en la fase temprana de la infección se sucedió una recuperación parcial de la infección con respecto al día 32 p.i., se produjo un mantenimiento de los niveles de IgG con respecto a los otros dos lotes, lo que confirma su ventaja sobre el empleo de la anfotericina B dimérica libre. Al haber tenido lugar una recuperación parcial de la infección, si hubiéramos sacrificado a los animales más tarde, probablemente hubiéramos observado un nuevo aumento de los niveles de anticuerpos. Pero no disponemos de datos para confirmarlo.

Por lo tanto, en los animales tratados con la formulación de HSA, independientemente del estado de agregación de la anfotericina B, se produjo un descenso en los niveles de IgG (apartado 3, figuras 22 y 23), lo que coincidía con el descenso en la carga parasitaria, aunque dicho descenso en la carga parasitaria fue menor con la anfotericina B monomérica.

Algunos autores observaron que la recuperación clínica y la disminución de los niveles de anticuerpos específicos eran solo transitorias después del tratamiento con Glucantime® o con Fungizona®, con recuperación de los valores normales varios meses después de la terapia (Riera y cols., 1999; Moreno y cols., 1999). El retorno a esos valores previos sería el causante de las recaídas; un ejemplo de esto fueron 67 perros tratados con anfotericina B, en los que se produjo un descenso en los títulos de anticuerpos pero con recaída en el 17% de los animales (Delgado, 2000). Aquellos casos en los que se empleó la formulación de HSA en el periodo sintomático de la

## **Discusión**

enfermedad y el descenso en los anticuerpos no fue tan evidente, pudiera ser debido a que al estar ya la infección más establecida y con anticuerpos ya elevados, la formulación a pesar de disminuir la carga, no fuera capaz de producir un descenso de anticuerpos más marcado.

También pudiera ser que como con estas formulaciones la eficacia no fue del 100%, no se consiguió una cura parasitológica total, pudiendo existir recuperación parcial de la infección, lo que contribuiría al mantenimiento de los anticuerpos en sangre. De hecho se ha sugerido que los altos títulos de anticuerpos observados en animales tratados estarían relacionados con una estimulación inmunológica por parte de los parásitos que sobreviven (Alvar y cols., 1994), y que la activación policlonal de las células B en cricetos parece depender del número de amastigotes en el bazo (Campos-Neto y cols., 1982). También se ha sugerido que la lisis del parásito dentro del macrófago podría dar lugar a la estimulación de linfocitos T CD4+ que estimularían a los B para seguir produciendo anticuerpos (Bourdoiseau y cols., 1997).

Pero lo que sí está claro, es que con la anfotericina B poliagregada se produjo descenso o mantenimiento de los niveles de IgG a cualquier dosis, tanto con la forma libre como con la encapsulada. Aunque hay que tener en cuenta que fueron necesarias dosis altas para observar un efecto más marcado en el descenso de IgG (apartados 5 y 6, figuras 26, 27, 30 y 31).

La gran eficacia encontrada con nuestra formulación de anfotericina B poliagregada formulada en HSA con dosis de entre 10 y 40 mg/Kg/día, junto con el mayor descenso en los niveles de IgG al emplearla en periodo sintomático de la enfermedad cuando ya existía una infección bien establecida, confirmó su ventaja frente a otras terapias y formulaciones ya existentes y apunta a que la disminución de los niveles de anticuerpos sí puede ser empleado, en este caso, como parámetro de seguimiento de la eficacia del fármaco en su aplicación frente a la leishmaniosis canina.

Además, la HSA a pesar de ser una proteína, no produjo ningún cambio en la respuesta inmune humoral (apartados 2.3 y 5, figuras 20, 21, 26 y 27). En este sentido hay que destacar que la albúmina sérica bovina ha sido empleada con éxito conjugada con metotrexato, en ratones Balb/c afectados de leishmaniosis visceral,

demostrándose su unión específica a macrófagos y su internalización y degradación en los lisosomas, permitiendo la total liberación del fármaco (Chakraborty y cols., 1990).

La proliferación de linfocitos B, causantes del exceso de producción de anticuerpos, da lugar a la formación de inmunocomplejos circulantes (López y cols., 1996). La acumulación de esos inmunocomplejos a nivel del glomérulo renal produce glomerulonefritis, constituyendo uno de los mecanismos patógenos que influyen en el agravamiento y letalidad en la leishmaniosis visceral. Así, en cricetos infectados por *L. donovani* se encontraron lesiones renales causadas por inmunocomplejos y claros depósitos de antígenos e inmunoglobulinas (Oliveira y cols., 1985; Sartori y cols., 1987; Sartori y cols., 1991). Y en cricetos infectados con *L. infantum* se demostró que los animales asintomáticos no presentaban inmunocomplejos en riñón (Requena y cols., 2000).

Teniendo en cuenta todo esto, decidimos determinar los inmunocomplejos en riñón solamente en aquellos experimentos en los que había existido una gran eficacia parasitológica y una importante disminución en los niveles de anticuerpos, porque considerábamos que en los demás experimentos no íbamos a encontrar diferencias sustanciales con respecto al control de infección. Los resultados muestran que en los lotes tratados con las dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada formulada en HSA, existieron menos inmunocomplejos en riñón que en los lotes control de infección (apartados 5 y 6, figuras 29 y 34). Dicha disminución supondría una mejoría en el curso de la enfermedad y, como era de esperar, fue mayor con la dosis de 40 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada formulada en HSA. Con la anfotericina B poliagregada a la dosis de 20 mg/Kg/día libre, la disminución de inmunocomplejos fue menor y ello podría ser debido a la mayor toxicidad de la anfotericina B libre, ya que hay que recordar que este principio activo produce nefrotoxicidad.

En la técnica de western-blot, el empleo de diferentes antígenos, como promastigotes de la fase exponencial o estacionaria, los diferentes grados de reducción debido a una diferente concentración de SDS y 2-mercaptoetanol en el tampón de muestra y la separación de las fracciones solubles y del pellet, contribuyen mucho a la variabilidad de resultados entre unos laboratorios y otros. Además, el

## **Discusión**

tamaño de los geles y la concentración de poliacrilamida, así como los distintos marcadores de peso molecular pueden causar variaciones a la hora de interpretar los resultados. En la leishmaniosis visceral aguda humana están presentes los antígenos de 14 y 16-18 KDa, apareciendo en el 80% de los individuos con prueba cutánea positiva (Marty y cols, 1994). Además de esos antígenos, los de 21, 23 y 31 KDa se consideran buenos marcadores de leishmaniosis visceral sintomática, pudiendo desaparecer después del tratamiento (Mary y cols., 1992; Marty y cols., 1995).

En nuestro caso, no pudimos realizar una comparación con lo sucedido en criceto, ya que no existen estudios sobre el efecto del tratamiento farmacológico en el perfil de reconocimiento antigénico en este modelo animal. Para nosotros, lo más significativo fue la desaparición de la banda de 55 KDa en los animales tratados con la formulación de albúmina sérica humana, siendo ese efecto más marcado al emplear las dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día, lo que estaba totalmente correlacionado con la gran eficacia obtenida (apartados 5 y 6, figuras 28, 32 y 33).

En la leishmaniosis visceral canina, dependiendo de los autores, existe gran variabilidad en los perfiles de reconocimiento antigénico debido a la falta de estandarización mencionada anteriormente. Después del tratamiento farmacológico desaparecieron bandas como las de 12-14 KDa (Riera y cols., 1999) ó las de 26, 29, 34-35.4 KDa y 67 KDa (Fernández-Pérez y cols., 1999; Vercammen y cols., 2002; Fernández-Pérez y cols., 2003).

Concretamente, en sueros de perros infectados naturalmente y tratados con Glucantime® y alopurinol se observó, en geles al 12.5 %, que antes del tratamiento aparecían bandas de 26, 29, 34, 35.4, 42, 45, 50, 57 y 67 KDa, con mayor reactividad frente a las proteínas de 67 KDa y de 29 KDa, existiendo una marcada pérdida de reactividad después del tratamiento, dependiendo de los antígenos considerados. Los antígenos de 26, 34 y 35.4 KDa mostraron una rápida respuesta al tratamiento cuando estaban presentes antes del mismo, desapareciendo a la vez que se produjo la mejoría clínica, es decir, su reconocimiento estaba restringido a periodos activos de la enfermedad, sugiriéndose que podrían ser usados como marcadores en estudios epidemiológicos y en el seguimiento de perros tratados. Además, la restricción del antígeno de 26 KDa a periodos de infección activa podría ser útil para determinar el

estado infectivo de los animales infectados hacia el vector (Fernández-Pérez y cols., 1999).

Al tratar perros naturalmente infectados con alopurinol, su suero reaccionó con antígenos de 17, 19, 26, 29, 34, 35.4, 50-57, 67, 68-94, >94 KDa, disminuyendo con el tratamiento la reactividad frente a las bandas de 29 y 67 KDa por parte de la IgG2 (Vercammen y cols., 2002). Cuando se compararon perros naturalmente infectados tratados con antimoniales y alopurinol y no tratados, aparecieron bandas de 29-30, 34-35.4, 42-45, 50-57 y 67 KDa en los no tratados, aunque con predominio de las de 29 y 50-57 KDa, siendo la IgG2 mucho más responsable de ese reconocimiento que la IgG1, cuya reactividad prácticamente se restringía a la región de 67 KDa. En la mayoría de los casos, los perros resistentes mostraron una respuesta predominante por IgG2 frente a los antígenos de 45 y 67 KDa, mientras que en los tratados desapareció el reconocimiento de la región de 67 KDa por parte de la IgG1 (Fernández-Pérez y cols., 2003).

En nuestro caso las bandas de bajo peso molecular no aportaron gran información, pero proponemos la de 55 KDa como marcador de la eficacia del tratamiento. También hay que tener en cuenta que los anticuerpos del criceto no tienen por qué reconocer las mismas proteínas que los del perro y que nuestros geles fueron realizados en gradiente de acrilamida al 5-20 %, mientras que la mayoría de los autores utilizan geles de entre 10 y 15 %, por lo que la interpretación de los resultados podría ser distinta.

#### ***4.2. Respuesta inmune celular.***

Como ya vimos en la discusión del modelo en criceto, los animales infectados con dosis más altas presentaron porcentajes mayores de células CD4+ en bazo que los infectados con la dosis menor.

No hemos realizado un experimento en el que se hayan ido sacrificando los animales a distintos tiempos, pero con los datos que tenemos observamos que dependiendo del día de sacrificio existió un aumento o mantenimiento del porcentaje de células CD4+ en bazo, en los lotes control de infección con respecto a los animales sanos. En los días 32 y 135 p.i. se produjo ese aumento (tablas 11 y 15); en el día 146

## **Discusión**

p.i., que fue cuando se realizaron la mayoría de las determinaciones (tablas 25, 32 y 37), existió mantenimiento casi siempre, pero sin embargo, a día 154 p.i. observamos de nuevo aumento (tabla 3). Pudiera ser que existieran fluctuaciones dependiendo del momento de evolución de la infección, pero como no realizamos una determinación de la carga parasitaria en función del tiempo no pudimos correlacionar ambos parámetros en ese sentido.

El hecho de que existiera un aumento de células CD4+ en los animales infectados parece estar en contradicción con lo que han observado otros autores en perro, ya que existen varios trabajos que han demostrado que con el progreso de la infección se producía un descenso de dicha subpoblación (Bourdoiseau y cols., 1997; Moreno y cols, 1999; Guarga y cols., 2000; Guarga y cols., 2002). Sin embargo, estos autores realizaron dicha determinación en sangre periférica, mientras que nosotros lo hicimos en bazo, no existiendo otros trabajos similares en criceto. Moreno y cols. (1999) demostraron que en perros infectados experimentalmente la pérdida de células T en sangre ocurría muy pronto en la infección, durante el periodo prepatente de la enfermedad, cuando aún no eran evidentes otros síntomas clínicos, pero el mecanismo responsable de la pérdida de CD4+ en sangre no se conoce. Podría ser que se hubiera producido apoptosis por un fallo en la presentación antigénica, pero también pudiera ser que se produjera la expresión de citoquinas de tipo Th2 inmunosupresoras.

Guarga y cols. (2000) sugirieron que el descenso de linfocitos en sangre podría ser la consecuencia de su migración específica hacia otros órganos. Pinelli y cols. (1994) especularon con la posibilidad de que la ausencia de hipersensibilidad retardada en perros susceptibles estuviera causada por un atrapamiento de linfocitos antígeno-específicos en sus órganos linfoides, y Milon y cols. (1986) mostraron que los nódulos linfáticos de ratones susceptibles tenían más células CD4+ que los de los resistentes. De hecho, el aclaramiento de parásitos de la piel se correlacionó con una infiltración y activación de células CD4+ y CD8+ en ratones infectados intradérmicamente (Ahmed y cols., 2003). En este sentido, si tenemos en cuenta que en nuestro caso encontramos en varios momentos de sacrificio, un aumento de células CD4+ en bazo, podría ser que hubieran migrado desde sangre, tal y como proponen estos autores.

El hecho de que migren hacia órganos específicos podría ser para intentar contrarrestar la infección en órganos diana, junto con las células CD4+ ya existentes. Engwerda y cols. (2000) señalaron que el desarrollo del granuloma en bazo para intentar contrarrestar la infección requería células CD4+, CD8+, IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-2 en ratones infectados con *L. donovani*. Pero era evidente que no lo conseguían por alguna razón. Una posible explicación sería que las células T CD4+ estuvieran activadas hacia un fenotipo Th2 productor de citoquinas incapaces de controlar la infección. En ese mismo trabajo se mostró que el fallo en resolver la infección en ratones infectados con *L. donovani* parecía implicar un fracaso de las células T y NK para activar eficazmente a los macrófagos infectados de la zona marginal del bazo; por otro lado, los macrófagos infectados podrían fallar en producir quimioquinas atrayentes, adecuadas para llevar a las células efectoras hacia su entorno; también podría ser que las células infectadas fueran incapaces de activar mecanismos microbicidas intrínsecos, después de la exposición a citoquinas y ligandos derivados de las células T y NK; y por último, los macrófagos infectados podrían inactivarse a sí mismos y a las células T, mediante la producción de factores solubles supresores o a través de interacciones antagonistas.

Otros trabajos mostraron que el incremento en la actividad de otras poblaciones celulares como las NK tampoco fue capaz de frenar la progresión de la enfermedad (Sartori y cols., 1999). En otros estudios empleando ratones infectados con *L. chagasi*, se vio que se producía un incremento progresivo de parásitos en bazo, a pesar de la extensa activación de las células T *in situ*, debido a una señalización negativa a través de CTLA-4 (que es un receptor de células T para los ligandos B7), que parecía jugar un papel importante en restringir la activación de las células T y la muerte del parásito en esos ratones con enfermedad crónica (Gomes y cols., 1998). Sin embargo, en ratones Balb/c infectados con *L. donovani*, sí se encontraron células T helper respondedoras que podrían mediar en el descenso de la carga parasitaria durante la infección (Holaday y cols., 1988), pero hay que recordar que en ese modelo experimental sí se consigue controlar la infección.

Por otro lado, se ha sugerido que el fallo funcional selectivo de las células presentadoras de antígeno para estimular linfocitos T específicos podría ser debido a su incapacidad para procesar y presentar los antígenos en el contexto del CMH de tipo II y se ha apuntado la posibilidad de que productos tóxicos liberados por los

## **Discusión**

macrófagos infectados pudieran ser responsables de la ausencia de estimulación (Rodrigues Jr y cols., 1992). En ratones se demostró que los macrófagos parasitados presentaban un descenso en la capacidad para expresar moléculas de Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (Reiner y cols., 1988), y eran incapaces de liberar señales coestimuladoras a las células T helper (Saha y cols., 1995). También se observó un descenso en la expresión de moléculas coestimuladoras, como B7, en macrófagos caninos (Pinelli y cols., 1999) lo que serviría al parásito como mecanismo adicional para evadir la respuesta inmune del hospedador y podría contribuir al deterioro de la respuesta inmune protectora mediada por células T. Como consecuencia, la débil presentación del antígeno por parte de los macrófagos infectados a las células T helper, es decir, el fallo en la coestimulación, podría dar lugar bien a una anergia de las células T respondedoras o bien a una muerte celular programada, o apoptosis, de dichas células.

En otros órganos como el glomérulo y el intersticio renal de perros afectados de leishmaniosis visceral también se encontraron infiltrados de células T CD4+ (Costa y cols., 2000), hecho que viene a apoyar la hipótesis de que las células CD4+ podrían migrar desde sangre hacia otros órganos, aunque debido a todas las posibles causas expuestas anteriormente, no serían capaces de hacer frente a la infección.

Guarga y cols. (2000) emplearon dobles marcajes (CD4/CD45RA) para diferenciar las células T helper nativas de las activadas. Nosotros no pudimos realizar ese doble marcaje para estudiar la activación celular. Lo que sí encontramos en algunos casos, es que algunos animales con porcentajes mayores de células CD4+ dentro de su lote, presentaron mayores niveles de anticuerpos y a veces eso también coincidió con una mayor carga parasitaria que en los demás animales de su lote. Al no poder combatirse la infección por parte de las células CD4+, la alta carga parasitaria existente sería la causante de los altos niveles de anticuerpos debido a una estimulación inmunológica (Alvar y cols., 1994) ya que, como ya hemos mencionado anteriormente, la activación policlonal de las células B en cricetos parece depender del número de amastigotes en el bazo (Campos-Neto y cols., 1982). En este sentido, Bourdoiseau y cols. (1997) observaron un descenso en sangre de los linfocitos que llevaban marcadores de células B, lo que estaría en contradicción con el hecho de la hipergammaglobulinemia que se produce en la leishmaniosis canina visceral, pero hay que tener en cuenta que esas células son menos numerosas en sangre porque se

infiltran en nódulos linfáticos, placas de Peyer, folículos esplénicos y médula ósea y es desde ahí donde ocurre la síntesis de anticuerpos.

Cuando se ensayó la formulación de HSA conteniendo anfotericina B dimérica a la dosis de 1 mg/Kg/día en la fase temprana de la infección, existió mayor porcentaje de células CD4+ en bazo en el día 135 p.i. con respecto al control de infección (tabla 15), aunque desde el momento del tratamiento se produjo un descenso o mantenimiento de los anticuerpos. Hay que tener en cuenta que en ese tiempo de sacrificio, la eficacia de la formulación de albúmina había disminuido con respecto al día 32 p.i. y pudiera ser que se estuviera empezando a recuperar la infección hacia valores normales de nuevo, por lo que estuviera empezando a aumentar la llegada de células CD4+ a bazo para intentar contrarrestar esa infección junto con las ya existentes. O que se hubiera producido un aumento de clones CD4+ Th1 para seguir luchando contra la infección. Desafortunadamente, no determinamos las células CD4+ entre el día 32 y 135 p.i. Como la activación policlonal de las células B en cricetos parece depender del número de amastigotes en el bazo (Campos-Neto y cols., 1982), si se estuviera produciendo esa recuperación de la infección y hubiéramos sacrificado a los animales más tarde, probablemente hubiéramos encontrado de nuevo un aumento en los niveles de anticuerpos a partir de día 135 p.i. Ese aumento de células CD4+ también se observó a día 146 p.i. al emplear la formulación de HSA conteniendo anfotericina B monomérica en la fase crónica de la enfermedad (tabla 25). Hay que tener en cuenta también la baja eficacia de dicha formulación y su mayor toxicidad, lo que podría contribuir a exacerbar los síntomas de la enfermedad y la explicación en cuanto a los porcentajes de células CD4+ y los niveles de anticuerpos sería la misma que en el caso anterior.

Con las formulaciones de HSA conteniendo anfotericina B dimérica o poliagregada a dosis bajas, no se observaron prácticamente cambios en dicha subpoblación en el día 146 p.i. con respecto al control de infección (tabla 25). Esto pudo ser debido a que a pesar de ser muy eficaces, el descenso en el número de parásitos no fuera lo suficientemente alto como para observar cambios en la subpoblación CD4+. Lo mismo ocurrió con las formulaciones de PLGA (datos no mostrados), siendo estas menos eficaces que las anteriores. Tampoco sabemos qué ocurrió en estadios intermedios entre el tratamiento y el día del sacrificio.

## Discusión

Pero lo más significativo de todo fue que con dosis de entre 10 y 40 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada se produjo un claro descenso de dicha población con respecto al control de infección en todos los casos (tablas 32 y 37). En la leishmaniosis canina se produjo una recuperación de los linfocitos CD4+ en sangre después de la terapia farmacológica (Bourdoiseau y cols., 1997; Moreno y cols., 1999; Guarga y cols., 2002). Si tenemos en cuenta nuestra hipótesis de que con la enfermedad los linfocitos CD4+ disminuirían en sangre por una migración hacia órganos específicos, con la terapia, el aumento de dicha población en sangre podría ser debido a la migración de dichas células en sentido contrario, desde bazo a sangre, por no ser necesarias ya en bazo. Es decir, aumentarían las células CD4+ en sangre coincidiendo con lo observado en perro, aunque no disponemos de datos en sangre para confirmarlo.

Otra posible explicación, es que se podría haber producido un efecto inmunomodulador por parte de la anfotericina B, que solo se observaría a partir de determinadas dosis. Como ya vimos en la revisión bibliográfica, varios trabajos mostraron que la anfotericina B a altas concentraciones, que están por encima del máximo nivel sérico obtenido en humanos, modificaban la función de las células B, T y polimorfonucleares (Marmer y cols., 1981; Walls y Key, 1982; Mehta y cols., 1985). La anfotericina B también influyó en la respuesta inmune humoral y celular, así como en la activación de macrófagos (Brajtburg y Bolard, 1996). Pero la proliferación de células T estuvo menos inhibida por anfotericina B incorporada en liposomas que por Fungizona® *in vitro* (Boggs y cols., 1991), lo que apunta a la importancia del encapsulamiento o carrier en el efecto de la molécula. Así, concentraciones muy altas de Fungizona® inhibieron la proliferación de los esplenocitos de ratón, mientras que altas concentraciones de AmBisome® no tuvieron efecto (Schindler y cols., 1993). También se vio que la anfotericina B influía en el procesamiento del antígeno y en la presentación por parte de las células infectadas, en ratones infectados con *Listeria monocytogenes* (Geginat y cols., 1999). De todas formas, hay que tener en cuenta que la sensibilidad de las células del sistema inmune a la anfotericina B parece depender de la especie animal, la magnitud del estímulo empleado para activar a los linfocitos, y de otras propiedades de los mismos, como por ejemplo su estado de diferenciación (Boggs y cols., 1991). En realidad, existe controversia en cuanto al efecto inmunomodulador y los diferentes resultados obtenidos pudieran ser debidos a una

influencia del estado de agregación de la molécula, aunque todos estos autores no mencionan dicho estado.

En nuestro caso decidimos realizar un ensayo para comprobar si la anfotericina B poliagregada formulada en HSA, ejercía algún efecto *per se* sobre la población CD4+ esplénica en cricetos sanos (apartado 7 de Resultados), encontrando que a dosis altas de 40 mg/Kg/día se producía un descenso de dicha población tanto a día 3 p.t. (76 p.i.), como a día 76 p.t. (146 p.i.) (tablas 39 y 40). A día 3 p.t. también se produjo descenso de la población CD4+ con la dosis de 2 mg/Kg/día, pero ese descenso no se mantuvo a día 76 p.t.

Por lo tanto, podríamos pensar que con dosis por encima de 10 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada, se produciría una disminución debido a un efecto de la anfotericina B *per se* sobre dicha subpoblación, por un mecanismo independiente de su actividad quimioterapéutica, ya que se ha demostrado que la anfotericina B no requiere células T, IL-12 ó IFN- $\gamma$  para ejercer su acción frente a *Leishmania*, al contrario de lo que ocurre con los antimoniales pentavalentes o con la pentamidina (Murray y cols., 1993; Murray, 2000; Murray y cols., 2000; Murray y Delph-Etienne, 2000; Murray y cols., 2001). Aún así, como no hemos podido determinar el efecto de la formulación sobre otras subpoblaciones linfocitarias, no podemos extraer una conclusión definitiva.

En las leishmaniosis viscerales humanas causadas por *L. donovani* y *L. infantum*, la principal característica inmunológica es la supresión total de la hipersensibilidad celular que da lugar a la multiplicación incontrolada del parásito y a intradermorreacción de Montenegro negativa, que sólo se hace positiva varios meses después de la curación del enfermo. Los casos subclínicos o asintomáticos se caracterizan por bajos niveles de anticuerpos, pero pueden mostrar anergia a los antígenos intradérmicos y desarrollar por lo tanto la enfermedad, o convertirse en seronegativos y positivos a la prueba cutánea, sugiriéndose una cura espontánea. Durante la leishmaniosis visceral aguda los pacientes no responden a la prueba cutánea, mientras que 6-12 meses después de la terapia exitosa, el test se convierte en positivo. Tanto la cura espontánea, como la inducida por fármacos se cree que se producen por una fuerte respuesta inmune protectora (revisado en Gradoni, 2001). En el caso de los perros, como ya hemos visto, los sujetos pueden ser divididos en varios

## Discusión

grupos: los que presentan anticuerpos negativos y respuesta proliferativa celular frente al antígeno de *Leishmania* (resistentes), los que presentan anticuerpos positivos y respuesta celular negativa (susceptibles), o puede ser que existan anticuerpos y células positivas (Cabral y cols., 1992; Cabral y cols., 1993; Cabral y cols., 1998; Pinelli y cols., 1994; De Luna y cols., 1999).

Así por ejemplo, existió proliferación celular frente al antígeno de *Leishmania* en células sanguíneas de algunos perros asintomáticos, sin embargo, algunos de los perros no respondedores al antígeno probablemente estuvieran inmunodeprimidos porque sus células tampoco fueron capaces de responder a concanavalina A (Cabral y cols., 1992). Más tarde se confirmaron esos resultados, existiendo proliferación celular frente al antígeno y frente a concanavalina A en perros asintomáticos, aunque frente al mitógeno existió mucha variabilidad en la respuesta (Cabral y cols., 1993, Cabral y cols., 1998). También se observó proliferación frente al antígeno y a concanavalina A en las células sanguíneas de perros asintomáticos, con inhibición de la proliferación antígeno-específica en los animales sintomáticos. Sin embargo, estos últimos animales también presentaron respuesta celular frente a concanavalina A de forma similar a la de los animales sanos y asintomáticos (Pinelli y cols., 1994).

Estos resultados no concuerdan con los de De Luna y cols. (1999), ya que estos autores observaron inhibición de la proliferación celular frente a antígenos y mitógenos (concanavalina A, fitohemaglutinina y PWM) en perros sintomáticos infectados naturalmente, demostrándose que dicha inhibición se producía desde estadios tempranos de la infección. Pero hay que tener en cuenta que los primeros autores usaron perros beagle infectados con una dosis simple de parásito y que evolucionaron lentamente hacia al enfermedad, y sin embargo, De Luna y cols. emplearon perros naturalmente infectados, que podrían haber recibido picaduras múltiples con la subsiguiente mayor estimulación de las células T, que podría provocar un perfil Th2 marcado por una profunda depresión de la respuesta. Las diferencias también podrían ser debidas al distinto número de perros usado, las distintas razas, la cepa de *Leishmania* aislada, etc.

En nuestro caso también encontramos ausencia de respuesta frente a los mitógenos en los animales control de infección, y como veremos más adelante, esto concordaba totalmente con lo observado en criceto. En otros estudios con perros

experimental y naturalmente infectados se inhibió la respuesta frente al antígeno de *Leishmania* y no se alteró tanto la proliferación frente a mitógenos, pero ésta fue ligeramente menor que en los animales sanos, siendo siempre la respuesta mayor frente a concanavalina A que frente a fitohemaglutinina, al igual que en nuestro caso, y mayor en los experimental que en los naturalmente infectados (Martínez-Moreno y cols., 1995). Rhalem y cols. (1999) tampoco encontraron respuesta frente al antígeno en perros natural o experimentalmente infectados, existiendo proliferación frente a concanavalina A, pero en los sintomáticos menos que en los asintomáticos o sanos.

En ratones Balb/c afectados de leishmaniosis visceral tampoco existió respuesta proliferativa frente al antígeno en los primeros estadios de la infección, pero como estos animales fueron capaces de controlar la infección, con el transcurso del tiempo se recuperó la capacidad proliferativa antígeno-específica (Murray y cols., 1982).

En cricetos existen pocos trabajos al respecto, pero se observa claramente una profunda inmunosupresión como consecuencia de la leishmaniosis visceral. Así por ejemplo, se encontró una disminución en la capacidad de los linfocitos esplénicos para proliferar frente a concanavalina A a los 15 días p.i. en cricetos consanguíneos, mientras que en cricetos dorados (Syrian golden) la inhibición apareció más tarde, pero después del día 35 p.i. todos presentaron una respuesta suprimida, siendo bajísima la respuesta en los últimos estadios de la infección. Frente al antígeno de *Leishmania*, en el día 21 p.i. aún existió proliferación pero desde ese momento hasta el día 60 p.i. disminuyó muchísimo (Nickol y Bonventre, 1985). En nuestro caso también encontramos una fuerte inmunosupresión desde estadios tempranos de la infección (día 32 p.i.) (tabla 12), que se mantuvo hasta estadios más tardíos (día 135 ó 145 p.i.) (tablas 16, 26, 33 y 39). Estos autores sugirieron la presencia en el purificado de células de una población supresora antígeno-específica (no adherente) de tipo T, que sería la causante de la pérdida de respuesta frente a mitógenos y antígenos. Riça-Capela y cols. (2003) también observaron disminución de la respuesta linfoproliferativa en cricetos infectados con promastigotes o amastigotes por vía intraperitoneal a medida que avanzaba la infección. Además, se observó que la activación policlonal de células B que daba lugar a la secreción de inmunoglobulinas estaba asociada con la inhibición de la respuesta celular T frente a fitohemaglutinina (Bunn-Moreno y cols., 1985). Por eso a lo mejor nosotros solo observamos recuperación de la respuesta

## Discusión

frente a fitohemaglutinina en aquellos animales en los que se produjo una mayor disminución de los niveles de anticuerpos, es decir en los tratados con las dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada formulada en HSA (tablas 33 y 39).

En cricetos infectados intradermicamente con *L. donovani*, las células linfoides sí fueron capaces de proliferar frente al antígeno, mientras que en los infectados intracardiamente las células de bazo, nódulo linfático o sangre no proliferaron frente al antígeno y además las células de bazo no proliferaron frente a concanavalina A, pero las de sangre sí (Gifawesen y cols., 1989). Al contrario que Nickol y Bonventre (1985) estos autores atribuyeron la falta de respuesta a las células adherentes, ya que al eliminar esas células del purificado de bazo se recuperó la respuesta frente al antígeno, pero en sangre no ocurrió lo mismo. Esas células adherentes con capacidad supresora, serían macrófagos y no linfocitos T, que estarían presentes solo en bazo y no serían responsables del fallo en la respuesta frente al antígeno de las células sanguíneas. Por lo tanto, la ausencia de respuesta frente al antígeno en sangre no sería debido a la presencia de células supresoras adherentes similares a las del bazo, sino que podría ser debida al recogimiento selectivo de células antígeno-reactivas a áreas con alta carga parasitaria como el bazo o a la presencia de factores supresores en el suero.

Más tarde se confirmó que las células adherentes de cricetos infectados con *L. donovani* inhibían la proliferación frente al antígeno *in vitro* de células de nódulos linfáticos de cricetos inmunizados con antígeno de *Leishmania* (Rodrigues Jr. y cols., 1998). La eliminación de células adherentes también restauró la respuesta proliferativa frente a fitohemaglutinina + ionomicina, apuntando a la posibilidad de algún defecto intrínseco en la ruta de señalización-transducción de la activación y proliferación de linfocitos, siendo la producción de NO en parte responsable de la inhibición de la proliferación en células expuestas a concanavalina A (Dasgupta y cols., 1999). Más recientemente, se ha demostrado que el ácido okadaico y el anti-TGF restauraban la respuesta linfoproliferativa después de la estimulación con fitohemaglutinina + ionomicina; es decir, las células adherentes ejercen un efecto supresor en las no adherentes mediante la inhibición de la ruta de activación en la que participa la proteinkinasa (Mookerjee y cols., 2003). En ratones Balb/c afectados de leishmaniosis visceral la inhibición de la respuesta celular también se había asociado a la presencia de células supresoras esplénicas de tipo adherente (Murray y cols., 1982).

Pero también se demostró que factores del suero de cricetos infectados con *L. baziliensis* suprimían la proliferación celular frente a mitógenos (O'Daly y cols., 1986) y en el suero de cricetos infectados con *L. donovani* existían factores que suprimían la proliferación celular (Evans y cols., 1990). Además, se inhibió la proliferación de células esplénicas frente a concanavalina A al añadir suero de cricetos infectados, restaurándose al añadir albúmina sérica bovina (que se caracteriza por su unión a ácidos grasos) por lo que los factores supresores del suero podrían ser lípidos, lipoproteínas y otros ácidos grasos (Vasconcellos y cols., 1996).

En cualquier caso, independientemente de la causa de la inhibición de la respuesta celular, después del tratamiento con antimoniales o pentamidina se produjo una restauración parcial o total de la proliferación linfoblástica frente al antígeno (Bourdoiseau y cols., 1997; Rhalem y cols., 1999; Rhalem y cols., 1999). Y después del tratamiento con anfotericina B (Intralipid®) también se restauró la respuesta proliferativa frente al antígeno y frente a fitohemaglutinina, pero a los 5 meses se recuperaron los valores normales (Moreno y cols., 1999), reflejando la ausencia de respuesta frente a fitohemaglutinina la severa inmunodepresión existente. Esto también lo observaron Guarga y cols. (2002), encontrando recuperación de la respuesta frente a fitohemaglutinina y frente al antígeno después del tratamiento con Glucantime®, pero con retorno posterior a los valores previos de no-respuesta. Por lo tanto, en algunos casos existiría un alto grado de inmunosupresión que el tratamiento no es capaz de restaurar. En otros casos los perros tratados con antimoniales mostraron respuesta proliferativa variable (Fernández-Pérez y cols., 2003). En el caso de los cricetos, después del tratamiento con Glucantime® se restauró la proliferación antígeno-específica, aunque siguió estando bastante deprimida frente a concanavalina A (Nickol y Bonventre, 1985). Al emplear estibogluconato de sodio también se restauró la respuesta celular después del tratamiento (Evans y cols., 1990).

Analizando nuestros resultados, encontramos que con el empleo de la pauta de tratamiento en la fase temprana de la infección no se produjo recuperación de la proliferación celular como consecuencia del tratamiento en los días de sacrificio (32 y 135 p.i.) (tablas 12 y 16), pero desconocemos lo ocurrido en estadios intermedios. Pudiera ser que a día 32 p.i. aún fuera muy pronto para poder observar recuperación de la proliferación celular por efecto del tratamiento, y si de día 32 p.i. a día 135 p.i. se hubiera producido dicha recuperación, ésta habría sido solo transitoria al igual que

## **Discusión**

observan Moreno y cols. (1999) y Guarga y cols. (2002). O también pudiera ser, que como aún existían muchos parásitos en los órganos a pesar de la reducción de la carga parasitaria por efecto del tratamiento, siguiera existiendo inhibición de la proliferación celular durante todo el periodo, es decir, seguiría existiendo inmunosupresión, ya que el descenso en la proliferación de las células frente a los antígenos parece ser dependiente de la carga parasitaria (Pinelli y cols., 1999).

En cuanto al empleo de la pauta de tratamiento en el periodo sintomático, en general observamos que con la anfotericina B dimérica libre o formulada en HSA y con la anfotericina B poliagregada formulada en HSA a la dosis de 2 mg/Kg/día, se produjo cierta recuperación de la proliferación celular frente a concanavalina A (tabla 26). Solamente en algún animal de los lotes tratados con las microesferas de PLGA, conteniendo anfotericina B poliagregada a la dosis de 2 mg/Kg/día, existió cierta proliferación frente a concanavalina A (datos no mostrados). En estos experimentos con los estados de agregación formulados en HSA o con las microesferas de PLGA, también disponemos solo de datos de linfoproliferación celular en el día del sacrificio y desconocemos lo ocurrido justo después del tratamiento o en otros estadios intermedios. Aquellos casos en los que no se produjo proliferación frente a fitohemaglutinina o al antígeno, a pesar de haber existido cierta eficacia, podrían ser reflejo de la inmunosupresión aún existente. También pudiera ser que entre el tratamiento y el momento del sacrificio se hubiera producido una recuperación de la respuesta antígeno-específica solo transitoria.

Lo que está claro es, que fueron necesarias dosis más altas de anfotericina B poliagregada para observar además de proliferación frente a concanavalina A, proliferación frente a fitohemaglutinina y frente al antígeno en el día del sacrificio (145 p.i.). Es decir, solo en aquellos animales en los que se produjo un total aclaramiento de los parásitos o en los que se produce una reducción muy elevada de la carga parasitaria (dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada), se observó proliferación antígeno-específica. Hay que señalar que los índices de estimulación frente a los mitógenos en estos animales no llegaron a alcanzar aún los valores de los animales sanos. A lo mejor era necesario que transcurriera más tiempo para observar una mayor proliferación, aunque, como ya hemos mencionado anteriormente no sabemos lo que ocurrió en puntos intermedios entre el momento del tratamiento y el sacrificio de los animales. En humanos por ejemplo, la

hipersensibilidad celular solo se hizo totalmente positiva varios meses después de la curación del enfermo (Carvalho y cols., 1981).

Moreno y cols. (1999) sugirieron que la pérdida de células CD4+ en sangre durante la leishmaniosis visceral canina sería responsable de la anergia frente a antígenos y mitógenos en esas células sanguíneas y demostraron que el aumento de células CD4+ en sangre después de la terapia se correlacionó con la restauración de la respuesta frente a mitógenos. Sin embargo, en nuestro caso a pesar del descenso en la subpoblación CD4+ en bazo, al emplear dosis por encima de 10 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada, se consiguió recuperar la respuesta celular proliferativa. Pudiera ser que la ausencia de respuesta linfoproliferativa en células esplénicas se debiera a defectos en las células presentadoras de antígeno, más que a las células CD4+. Estas células desarrollan un papel importante presentando antígenos y emitiendo señales secundarias o coestimuladoras a las células T para que éstas se activen. Para que una célula presentadora de antígenos elabore esas señales es necesario que se infecte y se active, ya que una presentación realizada por células no activadas conduce a la inhibición de las células T.

Como ya hemos mencionado anteriormente, el parásito ha desarrollado sus mecanismos para evitar la correcta coestimulación por parte de las células presentadoras de antígenos como por ejemplo los efectos inhibidores del receptor CTLA-4 (Gomes y cols., 1998). Por lo tanto, esos defectos en la estimulación linfocitaria podrían ser los causantes de la falta de respuesta proliferativa. Al disminuir considerablemente el número de parásitos por efecto de las dosis  $\geq 10$  mg/Kg/día, se volvería a producir una correcta estimulación celular con la consecuente respuesta frente a los mitógenos y antígenos *in vitro*. También pudiera ser que por el descenso en el número de parásitos se activaran las células T CD8+ protectoras capaces de favorecer la proliferación celular. De hecho en individuos asintomáticos se encontraron células CD8+ (Mary y cols., 1998) y estas células también fueron esenciales para la resolución de la infección primaria y para inducir resistencia a la reinfección en ratones infectados con *L. donovani* (Stern y cols., 1988), existiendo también más células CD8+ en perros asintomáticos infectados con dosis bajas (Pinelli y cols., 1995). Desdichadamente, nosotros no hemos podido medir dicha subpoblación celular.

## **5. PCR cuantitativa a tiempo real.**

En 1998 Melby y cols. lograron un gran avance al clonar y secuenciar porciones de cDNA de citoquinas para este modelo animal, determinando posteriormente su expresión en cricetos infectados con *L. donovani* mediante la técnica de Northern blot (Melby y cols., 1998; Melby y cols., 2001). En perros la técnica empleada para estudiar la expresión de citoquinas ha sido la RT-PCR convencional (Pinelli y cols., 1997; Pinelli y cols., 1999; Quinnell y cols., 2001; Santos-Gomes y cols., 2002). Sin embargo, con esas técnicas solo se consigue un análisis semicuantitativo de la expresión de RNAm mediante densitometría.

Por ello, nos propusimos poner a punto la técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real para determinar la expresión de esos genes de una manera cuantitativa. Esta técnica presenta la ventaja de que, una vez puesta a punto, es más cómoda y rápida que el Northern-blot o que la RT-PCR convencional y la cuantificación se realiza durante el propio proceso de amplificación. El único requisito indispensable para poder realizar esta técnica es obtener un solo producto de amplificación con los cebadores empleados. En un primer momento nos planteamos emplear los cebadores diseñados por Melby y cols. (1998), pero tuvimos algunas dificultades a la hora de obtener un solo producto, por lo que decidimos diseñar nuestros propios cebadores a partir de las secuencias de cDNA que ellos habían clonado y que están publicadas en el GenBank. Las condiciones de la PCR se han detallado ya en el capítulo de Material y Métodos, y en el capítulo de Resultados se han mostrado ejemplos de la aplicación de esta técnica. No fue posible realizar más determinaciones, ni estudiar más citoquinas, pero lo importante es que la técnica ya está puesta a punto para futuros experimentos en los que se pretenda estudiar el efecto inmunológico de nuevas formulaciones y nuevos fármacos frente a la leishmaniosis visceral. Además, la determinación de citoquinas también será útil en otros casos en los que se emplee este modelo animal, como el estudio de otras infecciones fúngicas, víricas o bacterianas.

Solamente determinamos la expresión de RNAm de IL-4, el IFN- $\gamma$  y el TGF- $\beta$  en el experimento de la puesta a punto del modelo en criceto (figuras 47, 48 y 49); en el estudio del efecto de la anfotericina B *per se* sobre en cricetos sanos, a día 3 p.t. (figuras 53, 54 y 55); y en otro experimento en el que se comparó la formulación de

HSA conteniendo anfotericina B poliagregada, a las dosis de 2 y 40 mg/Kg/día, en el día 3 p.t. (figuras 50, 51 y 52).

En cuanto al IFN- $\gamma$  lo más destacable fue la alta expresión de su RNAm en dos de los animales infectados y tratados con la dosis de 40 mg/Kg/día (figura 51). Pero lo más importante de todo es que en dicho lote se produjo una gran disminución en la expresión de RNAm de TGF- $\beta$  (figura 52), coincidiendo con la gran eficacia encontrada a esa dosis de anfotericina B (tablas 45 y 46), cosa que no ocurrió con la dosis de 2 mg/Kg/día. Sería interesante para futuros experimentos realizar un estudio a distintos tiempos, de la evolución de la expresión de estos genes antes y después del tratamiento con distintos fármacos.

Melby y cols. (1998, 2001) determinaron la expresión de citoquinas en linfocitos esplénicos de cricetos infectados con *L. donovani* los días 7, 14, 28 y 56 p.i., mientras que nosotros lo hicimos en estadios bastante más tardíos. Ellos demostraron que la progresión de la enfermedad ocurría en presencia de una expresión de RNAm de citoquinas Th1 desde las primeras semana p.i. La respuesta de IFN- $\gamma$  fue similar a la encontrada en humanos (Karp y cols., 1993) y concordaba con estudios previos de Gifawesen y Farrell (1989) que demostraban que las células T de animales infectados podían transferir hipersensibilidad retardada a animales sanos. Esto sugiere que la expresión de IFN- $\gamma$ , asociada al control de la infección en el modelo de *L. major* (Heinzel y cols., 1989) y en el modelo no letal murino de *L. donovani* (Squires y cols., 1989), no sería suficiente para controlar la replicación del parásito en cricetos, dando lugar a la muerte del animal. También sugirieron que lo que contribuía a una infección visceral incontrolada sería una respuesta ineficaz de las células frente al efector IFN- $\gamma$ , más que una ausencia de citoquinas. En nuestro caso también encontramos una gran expresión de RNAm de IFN- $\gamma$  en los animales infectados con dosis altas (figuras 48).

Melby y cols. (1998, 2001) detectaron expresión de RNAm de IL-12 desde el principio, por lo que la infección progresiva no estaría asociada con la ausencia de IL-12 en los estadios tempranos de la misma. Además, existió una ausencia de expresión de RNAm de NOS2, por lo que el deterioro de ese mecanismo efector crítico, podría explicar la incapacidad para controlar la infección en criceto. No se observó incremento en la expresión de IL-4 durante el curso de la infección. En este sentido, aunque en un estudio previo se demostró la expresión hepática de IL-4, esta citoquina

## Discusión

parecía no jugar un papel importante en la susceptibilidad del ratón frente a *L. donovani* (Kaye y cols., 1991). Por lo tanto, el deterioro en la expresión de RNAm de NOS2 tampoco estaría relacionado con un fenotipo dominante dirigido por IL-4 tal y como ocurría en ratones infectados por *L. major* (Heinzel y cols., 1989). Pero nosotros sí encontramos una disminución en la expresión de RNAm de IL-4 en casi todos los animales tratados con la formulación de HSA (figura 50).

En los estudios de Melby y cols. (1998, 2001) existió una expresión prominente de IL-10 y TGF- $\beta$  que se sabe que suprimen la activación de macrófagos y la expresión de NOS2 (Ding y cols., 1990; Gazzinelli y cols., 1992). El alto nivel de expresión de IL-10 en el hígado, bazo y médula ósea en el curso de la infección en este modelo fue similar a la expresión de RNAm de IL-10 observada en humanos (Karp y cols., 1993). En estos estudios con humanos, la co-expresión de IFN- $\gamma$  hizo que los autores postularan que durante la enfermedad activa la activación de los macrófagos por IFN- $\gamma$  estaría bloqueada por IL-10 (Vouldoukis y cols., 1997). La producción de la forma activa de TGF- $\beta$  podría contribuir al deterioro en la expresión de NOS2 y a la incapacidad para controlar la infección. Al igual que con la IL-10, el incremento de TGF- $\beta$  no ocurrió pronto en la infección, sugiriéndose que el TGF- $\beta$  no sería la principal razón para la pronta ausencia de expresión de NOS2. Sin embargo, es posible que la expresión basal de TGF- $\beta$  activo en hígado y bazo pudiera inhibir la expresión de NOS2 por parte de los macrófagos (debido probablemente a un efecto autocrino) y promover la susceptibilidad.

Los macrófagos murinos infectados con *L. major* produjeron TGF- $\beta$  en cantidad suficiente para suprimir su activación y cuando los macrófagos infectados fueron pretratados con TGF- $\beta$ , se bloqueó la muerte intracelular debida a NO mediada por IFN- $\gamma$  (Nelson y cols., 1991). Además, la neutralización *in vivo* de TGF- $\beta$  en la infección por *L. major* favoreció la producción de NO y promovió la cura en ratones (Li y cols., 1999). Rodrigues y cols. (1998) también demostraron que la producción de TGF- $\beta$  por parte de células adherentes de bazo de cricetos infectados, suprimía la respuesta proliferativa a los antígenos de *Leishmania*. En nuestro caso encontramos una disminución de la expresión de RNAm de esta citoquina al emplear la dosis de 40 mg/Kg/día de anfotericina B poliagregada encapsulada en albúmina, lo que contribuiría a la mejoría en el curso de la infección (figura 52).

En cuanto a los cricetos sanos tratados con la formulación de HSA, lo más notable es la inhibición de la expresión de RNAm de TGF- $\beta$  (figura 55). Pudiera ser que la formulación actuara *per se* disminuyendo los clones celulares productores o favorecedores del TGF- $\beta$ . En este sentido, existen trabajos que muestran que la anfotericina B induce la producción de TNF- $\alpha$ , que es una citoquina de tipo Th1 favorecedora de la actividad leishmanicida, por parte de macrófagos murinos *in vitro* (Chia y Pollack, 1989; Chia y McManus, 1990).

Respecto a la estimación de la carga parasitaria, la técnica clásica para el recuento de parásitos en tejidos es la realización de improntas. Esta técnica requiere mucho entrenamiento, mucho tiempo y es difícil en el caso de que haya pocos parásitos en la muestra, aumentando en ese caso la posibilidad de cometer errores. La técnica de recuento mediante dilución límite (Hill y cols., 1983; Titus y cols., 1985; Lima y cols., 1997) se realiza en placas de microtitulación conteniendo agar-sangre, que permite la transformación de amastigotes a promastigotes. Esta técnica es menos tediosa que el recuento de improntas pero hay que tener mucha precaución para evitar posibles contaminaciones y también está sujeta a alta variabilidad.

La PCR convencional ha sido ampliamente empleada en la detección y discriminación de parásitos patógenos, siendo más sensible que otros métodos de diagnóstico. Una variante de esta técnica, la PCR-ELISA, ha sido puesta a punto para conseguir una mayor sensibilidad en la detección (Costa JM y cols., 1996; Piñero y cols., 1999; Campino y cols., 2000; Martín-Sánchez y cols., 2001; Martín-Sánchez y cols., 2002), pero se emplea más para la detección que para la cuantificación de los parásitos.

Hasta la fecha existen pocos estudios aplicando técnicas a tiempo real para la cuantificación de parásitos. La PCR a tiempo real emplea sondas fluorescentes que permiten la monitorización continua de la formación del amplicón a lo largo de la reacción (revisado en Bell y Ranford-Cartwright, 2002). En el caso de *Leishmania* se ha desarrollado para cuantificar *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. mexicana* en tejidos de ratón (Nicolas y cols., 2002), pero estos autores obtienen dos productos de amplificación, uno de ellos inespecífico, hecho que contradice el principio fundamental de esta técnica: la obtención de un único producto. También se ha puesto a punto esta técnica para la cuantificación de *L. infantum* en el hígado de ratones

## **Discusión**

infectados (Bretagne y cols., 2001), pero empleando una sonda TaqMan. La PCR cuantitativa puesta a punto por nosotros presenta la ventaja de ser más barata que cuando se emplean sondas TaqMan, y se diferencia de la anterior en que nosotros empleamos como diana ADN del kinetoplasto y ellos el gen de la DNA polimerasa de *L. infantum*.

Encontramos una buena correlación entre los resultados obtenidos con la PCR cuantitativa y los obtenidos mediante el método clásico de la dilución límite (tabla 48), por lo que esta técnica puede ser muy útil, ya que es menos laboriosa y se pueden obtener los resultados de forma más inmediata.

Una vez puesta a punto la técnica, el objetivo más próximo es la cuantificación de parásitos en sangre, parámetro que sería muy útil para realizar un seguimiento de la evolución del tratamiento farmacológico sin necesidad de sacrificar a los animales y que se podría aplicar también a la leishmaniosis canina.

# ***Conclusiones***

## CONCLUSIONES.

1. Empleando un modelo de infección por *Leishmania infantum* en criceto dorado, con la dosis de  $10^7$  promastigotes en fase estacionaria, todos los animales desarrollan enfermedad, con cargas parasitarias elevadas en bazo e hígado, marcada esplenomegalia, disminución de peso y aumento de los niveles de IgG específica en suero.
2. El tratamiento en la fase temprana de la infección (días 25, 27 y 29 p.i.), con anfotericina B dimérica formulada en microesferas de HSA, a la dosis de 1 mg/Kg/día, produce un descenso rápido de la carga parasitaria acompañado de un aumento de la supervivencia y disminución de los niveles de IgG, en relación a los animales tratados con el fármaco libre, aunque más tardíamente la infección se reactiva.
3. De los tres estados de agregación de anfotericina B (monomérico, dimérico y poliagregado) formulados en microesferas de HSA, el dimérico y el poliagregado poseen una eficacia similar entre si y superior al monomérico, a la dosis de 2 mg/Kg/día, en el periodo sintomático de la enfermedad (días 69, 71 y 73 p.i.).
4. Los estudios de toxicidad aguda ponen de manifiesto que la toxicidad de la anfotericina B es mayor en los animales enfermos que en los sanos y que la formulación de microesferas de HSA la disminuye, resultando ser el estado poliagregado el menos tóxico de los tres.
5. Los tratamientos con anfotericina B poliagregada formulada en microesferas de HSA en el periodo sintomático de la enfermedad, a las dosis de 10, 20 y 40 mg/kg/día durante 3 días, consiguen eficacias del 99 - 100% de reducción de la carga parasitaria en bazo e hígado, con supervivencia de todos los animales hasta el final del estudio y aparente cura parasitológica en la mitad de ellos al emplear la dosis de 40 mg/Kg/día.

## Conclusiones

6. A las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día, las eficacias de la anfotericina B poliagregada libre y formulada en HSA son similares, aunque la forma libre presenta más toxicidad, ya que provoca la muerte de la mitad de los animales del grupo a la dosis mayor. En consecuencia, la nueva formulación ensayada es más segura por ser menos tóxica, ofreciendo la posibilidad de emplear dosis más altas, compatibles con la erradicación de la infección.
7. Los tratamientos con la anfotericina B poliagregada formulada en microesferas de HSA, a las dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día, promueven la disminución de los niveles de IgG y de los inmunocomplejos renales, así como la recuperación de la proliferación *in vitro* de esplenocitos frente a antígenos y mitógenos, lo que es indicativo de la mejoría en el transcurso de la enfermedad.
8. Las microesferas de HSA vacías no ejercen ningún efecto *per se* sobre la carga parasitaria, ni sobre la repuesta inmune estudiada, tanto en la fase temprana como en el periodo sintomático de la enfermedad.
9. De las dos formulaciones de PLGA ensayadas, la de Resomer<sup>®</sup> RG-503 es menos eficaz que la de Resomer<sup>®</sup> RG-502 y ésta a su vez menos eficaz que la de HSA. Con las formulaciones de PLGA no se produce disminución de los niveles de anticuerpos, ni cambios sustanciales en los otros parámetros inmunológicos.
10. Se ha puesto a punto una técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real para medir de la expresión de citoquinas (IL-4, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ ), que puede ser de utilidad en los estudios de leishmaniosis visceral, así como en otras infecciones donde se utilice el criceto dorado como animal de experimentación. Así mismo, se ha puesto a punto una técnica de PCR cuantitativa a tiempo real para la cuantificación de *L. infantum* en órganos.

# ***Bibliografía***

## BIBLIOGRAFIA.

### A:

- Agrawal AK, Agrawal A, Pal A, Guru PY, Gupta CM. 2002. Superior chemotherapeutic efficacy of Amphotericin B in Tuftsin-bearing liposomes against *Leishmania donovani* infection in hamsters. *Journal of Drug Targeting*, **10**: 41-45.
- Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, McMahon-Pratt D. 2003. Intra-dermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **71**: 401-410.
- Alexander J, Kaye PM. 1985. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clinical and Experimental Immunology*, **61**: 674-682.
- Alexander J, Philips RS. 1978. *Leishmania tropica* and *Leishmania mexicana*: cross-immunity in mice. *Experimental Parasitology*, **45**: 93-100.
- Allémann E, Gruny R, Leroux JC. 1998. Biodegradable nanoparticles of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. En: *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*. Vol. 3. 2ª edición. Marcel Dekker.
- Alvar J, 2001. *Las leishmaniasis: de la biología al control* (2ª ed.). Gráficas Varona, 37008 Salamanca.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus co-infection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 298-319.
- Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodríguez F y cols. 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **88**: 371-378.
- Alvar J. 1997. *Las leishmaniasis: de la biología al control* (1ª ed.). Gráficas Heraldo de Zamora, 49014 Zamora.
- Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Gupta PN, Saha SK, Ali N. 1999. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian Kala-azar patients. *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology*, **6**: 231-235.
- Ashford RW, 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1269-1281.
- Ashford RW. 1996. Leishmaniasis: reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, **14**: 523-532.
- Ashford RW. 1997. The leishmaniasis as model zoonoses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**: 693-701.

### B:

- Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson Jr WD. 1986. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, **154**: 1003-1011.
- Balkrishnan AR, Easwaran KR. 1993. CD and NMR studies on the aggregation of amphotericin B in solution. *Biochimica et biophysica acta*, **1148**: 269-77.
- Baneth G, Shaw SE. 2002. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, **106**: 315-324.
- Barwicz J, Christian S, Gruda I. 1992. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 2310-5.

## Bibliografía

- Barwicz J, Gareau R, Audet A, Morisset A, Villiard J, Gruda I. 1991. Inhibition of the interaction between lipoproteins and amphotericin B by some delivery systems. *Biochemical and biophysical research communications*, **181**: 722-8.
- Bates PA, Roberston CD, Tetley L, Coombs GH. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigotes-like forms. *Parasitology*, **105**: 193-202.
- Bates PA. 1993. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitology Today*, **9**: 143-146.
- Bekersky I, Dressler D, Fielding RM, Buell DN, Walsh TJ. 2000. *Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, abstract 856.
- Bell AS, Ranford-Cartwright LC. 2002. Real-time quantitative PCR in Parasitology. *Trends in Parasitology*, **18**: 337-342.
- Berman J, Dietze R. 1999. Treatment of visceral leishmaniasis with amphotericin B colloidal dispersion. *Chemotherapy*, **45**: 54-66.
- Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbahanmi K, Davidson R, Kuzoe F, Pang L, Weerasuriya K, Bryceson ADM. 1998. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, **76**: 25-32.
- Berman JD, Hanson WL, Chapman WL, Alving CR, López-Berestein G. 1986. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **30**: 847-51.
- Berman JD, Ksionski G, Chapman WL, Waits VB, Hanson WL. 1992. Activity of Amphotericin B Cholesterol Dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 1978-1980.
- Berman JD, Wyler DJ. 1980. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, **142**: 83-86.
- Berman JD. 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases*, **10**: 560-586.
- Berman JD. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*, **24**: 684-703.
- Beverly SM. Genetic and genomic approaches to the analysis of *Leishmania* virulence. In: Marr JM, Nilsen T, Komuniecki R, editors. 2003. *Molecular and Medical Parasitology*. New York: Academic Press, p. 111-122.
- Binhazim AA, Chapman WL Jr, Shin SS, Hanson WL. 1993. Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **54**: 113-121.
- Blackwell JM, Freeman D, Bradley D. 1980. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. *Nature*, **283**: 72-74.
- Blackwell JM. 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology*, **112**: S67-S74.
- Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Current Opinion in Immunology*, **8**: 517-525.
- Bogdan C, Rollinghoff M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, **28**: 121-134.
- Bogdan C, Röllinghoff M. 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages?. *Parasitology Today*, **15**: 22-28.
- Boggs JM, Chang NH, Goundalkar A. 1991. Liposomal amphotericin B inhibits *in vitro* T-lymphocyte response to antigen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 1976-1980.
- Bolard J, Legrand P, Heitz, Cybulska B. 1991. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry*, **30**: 5707-15.

- Bolard J. 1991. Modulation of the immune defences against fungi by amphotericin B and its derivatives, p. 293-305. In: Yamaguchi H, Kobayashi GS, Takakashi H (ed.), *Recent progress in antifungal chemotherapy*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bories C, Coffin C, Mathieu D, Bories PN, Scherman E, Rivollet D, Deniau M. 1998. Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **92**: 685-692.
- Botet Fregola J, Portús Vinyeta M. 1993. La Leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, **67**: 255-266.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **59**: 21-30.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-André I, Chabanne L. 1997. Lymphocyte subsets abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **56**: 345-351.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Review of Biochemistry*, **72**: 248-54.
- Bradley DJ. 1974. Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature*, **250**: 353.
- Bradley DJ. 1989. Lsh: origins and growth of a cottage industry. *Research in Immunology*, **140**: 827-828.
- Brajtburg J, Bolard J. 1996. Carrier effects on biological activity of Amphotericin B. *Clinical Microbiology Reviews*, **9**: 512-531.
- Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. 1990. Amphotericin B: current understanding of mechanism of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **24**: 183-188.
- Brandonisio O, Ceci L, Cedola MC, Caretto G, Antonaci S, Jirillo E. 1986. Phagocytosis of *Leishmania infantum* promastigotes by monocytes isolated from *Leishmania*-infected dogs. *Microbiologica*, **9**: 173-178.
- Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda L, Fumarola L, Leogrande D. 2000. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia*, **42**: 183-190.
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. 2001. Real-Time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**: 828-831.
- Brittingham A, Mosser DM. 1996. Exploitation of the complement system by *Leishmania promastigotes*. *Parasitology Today*, **12**: 444-447.
- Buffet PA, Garin YJF, Sulahian A, Nassar N, Derouin F. 1996. Therapeutic effect of reference antileishmanial agents in murine visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **90**: 295-302.
- Bullen DVR. 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, **18**: 332-334.
- Bunn-Moreno MM, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A. 1985. Hypergammaglobulinemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. *Clinical and Experimental Immunology*, **59**: 427-434.

## C:

- Cabral M, Mcnerney R, Gomes S, O'Grady J, Frame I, Sousa JC, Miles MA, Alexander J. 1993. Demonstration of natural *Leishmania* infection in asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **70**: 473-479.

## Bibliografía

- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, **76**: 173-180.
- Cabral M, O'Grady JO, Alexander J. 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*, **14**: 531-539.
- Callahan HL, Portal AC, Devereux R, Grogil M. 1997. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 818-822.
- Campino L, Cortes S, Pires R, Oskam L, Abranches P. 2000. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical and Microbiological diseases*, **19**: 396-398.
- Campos-Neto A, Bunn-Moreno MM. 1982. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. *Infection and Immunity*, **38**: 871-876.
- Carrera L, Fermín ML, Tesouro M, García P, Rollán E, González JL, Méndez S, Cuquerella M, Alunda JM. 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *L. infantum*: Infection course antigen markers. *Experimental Parasitology*, **82**: 139-146.
- Carrió J, de Colmenares M, Riera C, Gállego M, Arboix M, Portús M. 2000. *Leishmania infantum*: Stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. *Experimental Parasitology*, **95**: 209-214.
- Carvalho EM, Teixeira RS, Jonson WD Jr. 1981. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infection and Immunity*, **33**: 498-502.
- Castagnola E, Davidson RN, Fiore P, Tasso L, Rossi G, Mangraviti S, Di Martino L, Scotti S, Cascio A, Pempinello R, Gradoni L, Giacchino R. 1996. Early efficacy of liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**: 317-318.
- Catálogo de especialidades farmacéuticas. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2003.
- Cavalier Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **73**: 203-66.
- Chakraborty P, Bhaduri AN, Das PK. 1990. Neoglycoproteins as carriers for receptor-mediated drug targeting in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Protozoology*, **37**: 358-364.
- Chang KP. 1980. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science*, **209**: 1240-1242.
- Chia JKS y McManus EJ. 1990. *In vitro* tumor necrosis factor induction assay for analysis of febrile toxicity associated with amphotericin B preparations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**: 906-908.
- Chia JKS, Pollack M. 1989. Amphotericin B induces tumor necrosis factor production by murine macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*, **159**: 113-116.
- Cobbold S, Metcalfe S. 1994. Monoclonal antibodies that define homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, **43**: 137-154. En: Alvar J, Moreno J. 2002. *Trends in Parasitology*, **18**: 399-405.
- Conte U, Giunchedi P, Maggi L, Torre ML. 1994. Spray dried albumin microspheres containing nicardipine. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, **40**: 203-8.
- Corradin S, Mael J, Ransijn A, Sturzingger C, Vergeres G. 1999. Down-regulation of MARCKS-related protein (MRP) in macrophages infected with *Leishmania*. *The Journal of biological Chemistry*, **274**: 16782-16787.
- Cortadellas O. 2003. Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **17**: 808-812.

- Costa FAL, Guerra JL, Silva SMMS, Klein RP, Mendonça IL, Goto H. 2000. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**: 1455-1458.
- Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, Vidaud M, Bretagne S. 1996. PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. 1996. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**: 1831-1833.
- Croft SL, Davidson RN, Thornton EA. 1991. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **28 (Suppl. B)**: 111-118.
- Croft SL. 1997. The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology*, **114**: S3-S15.
- Crofts MA. 1976. Use of amphotericin B in mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**: 111-113.
- Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodríguez A, Alvar J. 2002. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, **359**: 1124-1125.

## D:

- D'Souza MJ, Oettinger CW, Shah A, Tipping PG, Huang XR, Milton GV. 1999. Macrophage depletion by albumin microencapsulated clodronate: attenuation of cytokine release in macrophage-dependent glomerulonephritis. *Drug Development and industrial pharmacy*, **25**: 591-6.
- Dasgupta S, Mookerjee A, Chowdhury SK, Chose AC. 1999. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis: an evaluation of the role of nitric oxide toward impairment of the lymphoproliferative response. *Parasitology Research*, **85**: 594-596.
- Davidson RN, Croft SL, Scott A, Maini M, Moody AH, Bryceson ADM. 1991. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet*, **337**: 1061-1062.
- Davidson RN, di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Gaeta GB, Pempinello R, Scotti S, Cascio A, Castagnola E, Maisto A, Gramiccia M, di Caprio D, Wilkinson RJ, Bryceson AD. 1996. Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clinical Infectious Diseases*, **22**: 938-943.
- Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Russo R, Gaeta GB, Pempinello R, Scott S, Raimondi F, Cascio A y cols. 1994. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Quarterly Journal of Medicine*, **87**: 75-81.
- Davies CE, Cooper AM, Peacock C, Lane RP, Blackwell JM. 1990. Expression of LPG and gp63 by different development stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, **101**: 337-343.
- Davies CR, Mazloui Gavani AS. 1999. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology*, **119**: 247-257.
- De Krey GK, Titus RG. 1999. A method for the isolation and analysis of leucocytic cells from leishmanial ear lesions in mice. *Journal of Immunological Methods*, **228**: 1-11.
- De Luna R, Vuotto ML, Ielpo MTL, Ambrosio R, Piantadosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **70**: 95-103.
- Delgado J. 2000. Treatment of canine leishmaniasis with Amphotericin B. Retrospective study. En: Canine leishmaniasis: treatment and follow-up. *Cost B9 Expert Meeting*. Madrid, October 20-21, 2000.
- Denerolle P, Bourdoiseau G. 1999. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **13**: 413-415.
- Deplazes P, Arnold P, Skaggs J, Gessler M. 1992. Parasitological and immunological progress during and after chemotherapy of leishmaniasis in dogs. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, **134**: 85-93.
- Desjeux P. 1996. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, **14**: 417-23.

## Bibliografía

- di Martino L, Davidson RN, Giacchino R, Scotti S, Raimondi F, Castagnola E, Tasso L, Cascio A, Gradoni L, Gramiccia M, Pettoello-Mantovani M, Bryceson ADM. 1997. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin B. *The Journal of Pediatrics*, **131**: 271-277.
- Dietze R, Fagundes SMS, Brito EF, Milan EP, Feitosa TF, Suassuna FA, Fonschiffrey G, Ksionski G, Dember J. 1995. Treatment of kala-azar in Brazil with Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days. *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 309-311.
- Dietze R, Milan EP, Berman JD, Grogl M, Falqueto A, Feitosa TF, Luz KG, Suassuna FA, Marinho LA, Ksionski G. 1993. Treatment of Brazilian kala-azar with a short course of Amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion). *Clinical Infectious Diseases*, **17**: 981-986.
- Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S. 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- $\gamma$ . *Journal of Immunology*, **145**: 940.
- Domínguez M, Toraño A. 1999. Immune adherence-mediated opsono-phagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, **189**: 25-35.
- Donovan C. 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal*, **2**: 79.
- Duncan R, Alvarez R, Jaffe CL, Wiese M, Klutch M, Shakarian A y col. 2001. Early response gene expression during differentiation of cultured *Leishmania donovani*. *Parasitology Research*, **87**: 897-906.

## E:

- Endo L, Corman LC, Panush RS. 1985. Utilidad clínica de las valoraciones de complejos inmunitarios circulantes. En: Clínicas Médicas de Norteamérica. Inmunología Clínica II. Interamericana Ediciones, vol. 4: pp. 655-669.
- Engwerda CR, Kaye PM. 2000. Organ specific immune response associated with infectious disease. *Immunology Today*, **21**: 73-78.
- Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SEJ, Smelt SC, Kaye PM. 1998. Neutralisation of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *European Journal of Immunology*, **28**: 669-680.
- Ephros M, Waldman E, Zilberstein D. 1997. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 1064-1068.
- Escobar P, Yardley V, Croft SL. 2001. Activities of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), Ambisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1872-1875.
- Evans TG, Smith D, Pearson RD. 1990. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Journal of Parasitology*, **76**: 212-217.

## F:

- Farrell JP. 1976. *Leishmania donovani*: acquired resistance to visceral leishmaniasis in the golden hamster. *Experimental Parasitology*, **40**: 89-94.
- Fernández-Pérez FJ, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Alunda JM. 2003. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Tropica*, **86**: 83-91.
- Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de la Fuente C, Cuquerella M, Gómez MT, Alunda JM. 1999. Value of western-blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11**: 170-3.

- Fielding RM, Singer AW, Wang LH, Babbar S, Guo LS. 1992. Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 299-307.
- Figueras Nadal Mf Mc, García De Miguel MFMJ, Asenti Botet F, Velasco Bernardo R, Canals Baeza A, Ausin Aoiz I. 2003. Short course treatment for visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B in immunocompetent patients. *Anales de Pediatría*, **59**: 535-540.
- Fragaki K, Suffia I, Ferrua B, Rousseau D, le Fichoux Y, Kubar J. 2001. Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine*, **19**: 1701-1709.
- Freire M, Badaro F, Avelar ME, Luz K, Nakatani MS, Teixeira R, Netto EM, Badaro R. 1997. Efficacy and tolerability of liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **1**: 230-240.

## G:

- Gaboriau F, Cheron M, Petit C, Bolard J. 1997. Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its *in vitro* toxicity: a new way to improve its therapeutic index. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 2345-51.
- Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJF, Derouin F. 1996. Lipid formulations of amphotericin B in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**: 574-577.
- Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJF, Derouin F. 1998. Experimental assessment of alternative therapies in the treatment of *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis. *Parasitology International*, **47** (Suppl.): 237.
- Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJF, Farinotti R, Derouin F. 1996. Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**: 1214-1218.
- Gardener PJ. 1975; en: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. Peters W, Killick-Kendrick R (ed.). Academic Press, London.
- Gaspar R, Opperdoes FD, Preat D, Roland R. 1992. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: *in vitro* activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **80**: 41-49.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. *Journal of Immunology*, **148**: 1792.
- Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D. 1992. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line: THP-1. *Acta Tropica*, **51**: 237-245.
- Geginat G, Kretschmar M, Walter S, Junker D, Hof H, Nichterlein T. 1999. Suppression of acquired immunity against *Listeria monocytogenes* by amphotericin B-mediated inhibition of CD8 T cell function. *The Journal of Infectious Diseases*, **180**: 1186-94.
- Gelfand JA, Kimbali K, Burke JF, Dinarello CA. 1988. Amphotericin B, treatment of human mononuclear cells *in vitro* results in secretion of tumor necrosis factor and interleukin-1. *Clinical Research*, **36**: 456a.
- Ghose AC, Mookerjee A, Sengupta K, Ghosh AK, Dasgupta S, Ray PK. 1999. Therapeutic and prophylactic uses of Protein A in the control of *Leishmania donovani* infection in experimental animals. *Immunology Letters*, **65**: 175-181.
- Ghosh AK, Ghosh DK. 1987. Infection pattern of leishmaniasis in hamsters produced by recent isolates from kala-azar patients in India. *The Indian Journal of Medical Research*, **86**: 14-19.
- Gifawesen C, Farrell JP. 1989. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infection and Immunity*, **57**: 3091-3096.

## Bibliografia

- Golenser J, Frankenburg S, Ehrenfreund T, Domb AJ. 1999. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin B-arabinogalactan water-soluble derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 2209-2214.
- Gomes NA, Barreto-de-Souza V, Wilson ME, DosReis G. 1998. Unresponsive CD4+ T lymphocytes from *Leishmania chagasi*-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. *The Journal of Infectious Diseases*, **178**: 1847-51.
- Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania* infection. *European Journal of Immunology*, **28**: 687-695.
- Goto H, Carneiro Leao RC, Ribeiro da Mata VL, Yamashiro EH. 1987. Immunological parameters of visceral leishmaniasis of *Leishmania major*-infected hamsters. *Allergologia et Immunopathologia*, **15**: 349-353.
- Gradoni L, Bryceson A, Desjeux P. 1995. Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*, **73**: 191-7.
- Gradoni L, Davidson RN, Orsini S, Betto P, Giambenedetti M. 1993. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania infantum* and tissue distribution in mice. *Journal of Drug Targeting*, **1**: 311-316.
- Gradoni L. 1996. Chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis: advances and failures. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **9**: 435-438.
- Gradoni L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology*, **100**: 87-103.
- Gramiccia MI, Smith DF, Angelici MC, Ready PD, Gradoni I. 1992. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitology*, **105**: 29-34.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology*, **144**: 278-283.
- Grimaldi G, Moriearty PL, Hoff R. 1980. *Leishmania mexicana*: immunology and histopathology in C3H mice. *Experimental Parasitology*, **50**: 45-56.
- Gruda I, Nadeau P, Brajtburg J, Medoff G. 1980. Application of differential spectra in the ultraviolet-visible region to study the formation of amphotericin B-sterol complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **602**: 260-8.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribañez MA, Alvar J, Castillo JA. 2000. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Research in Veterinary Science*, **69**: 249-253.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribañez MA, Castillo JA. 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **88**: 13-20.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, **2**: 494-501.
- Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. 2001. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, **17**: 150-153.

## H:

- Handman E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 229-243.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. 1989. Reciprocal expression of interferon-gamma or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence for expansion of distinct helper T-cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*, **169**: 59-72.

- Heinzl FP, Sadick MD, Motha SS, Locksley RM. 1991. Production of interferon 1, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**: 7011-7015.
- Herwaldt BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, **354**: 1191-1199.
- Hill JO, North RJ, Collins FM. 1983. Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **39**: 1087-1094.
- Hoeprich PD. 1990. Elimination half-life of amphotericin B. *Journal of Infectology*, **20**: 173-174.
- Holaday BJ, Sadick MD, Pearson RD. 1988. Isolation of protective T cells from Balb/cJ mice chronically infected with *Leishmania donovani*. *The Journal of Immunology*, **141**: 2132-2137.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89**: 55-73.
- Honoré S, Garin YJF, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F. 1998. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **21**: 231-239.

## J:

- Jones D, Elloso MM, Showe L, Williams D, Trinchieri G, Scott P. 1998. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, **66**: 3818- 1824.
- Jones TC. 1996. The effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) on macrophage function in microbial disease. *Medical Oncology*, **13**: 141-7.
- Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. 1996. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science*, **274**: 421-423.

## K:

- Karp CL, El-Safi SH, Wynn TA, Satti MMH, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks DL. 1993. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *The Journal of Clinical Investigation*, **91**: 1644-1648.
- Kaye PM, Curry AJ, Blackwell JM. 1991. Differential production of Th1 and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled vaccine induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **146**: 2763-2770.
- Kaye PM, Gorak P, Murphy M, Ross S. 1995. Strategies for immune intervention in visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89 (Suppl. 1)**: 75-81.
- Kayser O, Olbrich C, Yardley V, Kiderlen AF, Croft SL. 2003. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, **254**: 73-75.
- Kelso A. 1995. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. *Immunology Today*, **16**: 374-379.
- Kemp M, Kurtzhals JAL, Bendtzen K, Poulsen LK, Hansen MB, Koech DK, Kharazmi A, Theander TG. 1993. *Leishmania donovani*-reactive Th1 and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **61**: 1069-1073.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW. 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proceeding of the Royal Society, London* **B187**: 409-419.
- Killick-Kendrick R. 1979. En: *Biology of the Kinetoplastida*, Vol 2. Lumsden WHR y Evans DA (ed.). Academic Press, London-New York.

## Bibliografía

- Krause HJ, Medoff JG, Schlessinger D, Kobayashi GS. 1974. Characterization of the binding of amphotericin B to *Saccharomyces cerevisiae* and relationship to the antifungal effects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **6**: 770-776.

## L:

- Labrada M, Weigle K, Valderrama L, Saraiva NG. 1989. Evaluación de la respuesta de isotipos de inmunoglobulinas específicas a *Leishmania* en leishmaniasis tegumentaria americana. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **84**: 409-416.
- Lainson R, Shaw JJ. 1987. En: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. Peters W, Killick-Kendrick R (ed.). Academic Press, London.
- Lambing HE, Wolf BD, Harstel SC. 1993. Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1152**: 185-8.
- Lamothe J. 1997. Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotericine B: 39 cas. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, **32**: 133-141.
- Lamothe J. 2001. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *The Journal of Small Animal Practice*, **42**: 170-175.
- Larabi M, Yardley V, Loiseau PM, Appel M, Legrand P, Gulik A, Borjes C, Croft SL, Barratt G. 2003. Toxicity and antileishmanial activity of a new stable lipid suspension of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 3774-3779.
- Larreta R, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C, Requena JM. 2002. Antigenic properties of the *Leishmania infantum* GRP94 and mapping of linear B-cell epitopes. *Immunology Letters*, **80**: 199-205.
- Lasri S, Sahibi H, Natami A, Rhalem A. 2003. Western-blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **91**: 13-18.
- Launois P, Maillard J, Pingel S, Swihart KG, Xenarios I, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA. 1997. IL-4 rapidly produced V $\beta$ 4V $\alpha$ 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*, **6**: 541-549.
- Launois P, Swihart KG, Milon G, Louis JA. 1997. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *Journal of Immunology*, **158**: 3317-3324.
- Laurenti MD, Cobertt CEP, Sotto MN, Sinhorini IL, Goto H. 1996. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *International Journal of Experimental Pathology*, **77**: 15-24.
- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romao P, Cortes S, Rolao N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 e IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **79**: 273-284.
- Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J y Milon G. 1996. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice. A tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *Journal of Immunology*, **157**: 4537-4545.
- Legrand P, Romero EA, Cohen BE, Bolard J. 1992. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 2518-22.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 1993. *Principios de Bioquímica*. 2ª edición. Ed. Omega S.A.
- Leishman WB. 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal*, **1**: 1252-1254.
- Li J, Hunter CA, Farrel JP. 1999. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *Journal of Immunology*, **162**: 974-9.
- Liew FY, O'Donnell CA. 1993. Immunology of leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, **32**: 161-259.

- Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus PG. 1997. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitology Today*, **13**: 80-82.
- Lima HC, Titus RG. 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, **64**: 5442-5445.
- Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Rollinghoff M. 1998. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *International Archives of Allergy and Immunology*, **115**: 191-202.
- Loiseau PM, Imbertie L, Bories C, Betheder D, De Miguel I. 2002. Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 1597-1601.
- López R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martín E, Molleda JM. 1996. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B: Journal of Veterinary Medicine. Series B*, **43**: 469-474.
- Luftenstein CP, Viernstein H. 1998. Statistical experimental design based studies on placebo and mitoxantrone-loaded albumin microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, **171**: 87-99.

## M:

- Malik R, Craig AJ, Wigney DI. 1996. Combination chemotherapy of canine and feline cryptococcosis using subcutaneously administered amphotericin. *Australian Veterinary Journal*, **73**: 124-128.
- Mannheimer SB, Hariprasad J, Stoeckle MY, Murray HW. 1996. Induction of macrophage antiprotozoal activity by monocyte chemotactic and activating factor. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **14**: 59-61.
- Marmer DJ, Fields BT, France GL Jr, Steele RW. 1981. Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B methyl ester: Comparative *in vitro* and *in vivo* toxicological effects on neutrophil function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **20**: 660-665.
- Martindale, the Extra Pharmacopoeia. The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 32<sup>a</sup> edición. 1999.
- Martínez-Moreno A, Martínez-Cruz MS, Blanco A, Hernández Rodríguez S. 1993. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, **51**: 49-59.
- Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. 1995. Humoral and cell mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **48**: 209-220.
- Martín-Sánchez J, López-López MC, Acedo-Sánchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Márquez F. 2001. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology*, **122**: 607-615.
- Martín-Sánchez J, Pineda JA, Andréu-López M, Delgado J, Macías J, de la Rosa R, Morillas-Márquez F. 2002. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **96**: 669-677.
- Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Rahal A, Gari-Toussaint M, Le-Fichoux Y. 1994. Use of the leishmanin skin test and western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France). *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**: 658-659.
- Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulalio M, Gari-Toussaint M, Le-Fichoux Y, Kubar J. 1995. Detection by western-blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 690-691.
- Mary C, Auriault V, Faugère B, Dessein AJ. 1998. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8+ and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4+ antigen-specific T cells. *Infection and Immunity*, **67**: 5559-5566.

## Bibliografía

- Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M. 1992. Western-blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **47**: 764-771.
- Mathias R, Costa FAL, Goto H. 2001. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **34**: 539-543.
- Mael J, Behin R, Louis M. 1981. *Leishmania enriettii* immune induction of macrophage activation in an experimental model of immuno-prophylaxis in the mouse. *Experimental Parasitology*, **148**: 393-407.
- Mazerski J, Grzybowska J, Borowski E. 1990. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *European Biophysics Journal*, **18**: 159-64.
- Mehta RT, Mehta K, López-Berenstein G, Juliano RL. 1985. Effect of liposomal amphotericin B on murine macrophages and lymphocytes. *Infection and Immunity*, **47**: 429-433.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *Journal of Immunology*, **166**: 1912-20.
- Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale JM. 2001. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Experimental Parasitology*, **99**: 17-25.
- Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL. 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **66**: 2135-2142.
- Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. 1998. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, **66**: 18-27.
- Méndez S, Fernández-Pérez FJ, Santin M, De la Fuente C, Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Alunda JM. 2001. Correlation between *in vitro* and *in vivo* infectivity of *Leishmania infantum* clones. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**: 616-621.
- Méndez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Seiky YAW, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D. 2001. The potency and durability of DNA and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose intradermal challenge. *The Journal of Immunology*, **166**: 5122-5128.
- Méndez S, Nell M, Alunda JM. 1996. *Leishmania infantum*: infection of macrophages *in vitro* with promastigotes. *International Journal for Parasitology*, **26**: 619-622.
- Méndez Sierra Susana. 1997. Metaciclógénesis en *Leishmania infantum*: identificación y caracterización del estadio infectante, desarrollo de un modelo de infección *in vitro* y aplicación al cribado farmacológico. Tesis Doctoral.
- Milon G, Titus RG, Cerottini J, Marchal G, Louis JA. 1986. Higher frequency of *Leishmania major*-specific L3T4+ T cells in susceptible Balb/c as compared with resistant CBA mice. *Journal of Immunology*, **136**: 1467-1471.
- Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. 1994. Th1 and Th2 cell associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **62**: 1058-1063.
- Miró G, Fraile C. 1999. Leishmaniosis canina: revisión práctica. *Consulta*, vol. **7**, nº 56: 62-74.
- Mishra M, Biswas UK, Jha DN, Khan AB. 1992. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. *Lancet*, **340**: 1256-1257.
- Montalbán C, Calleja JL, Erice A, Laguna F, Clotet B, Podzamczar D, Cobo J, Mallolas J, Yebra M, Gallego A. 1990. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS. *Journal of Infections*, **21**: 261-270.
- Mookerjee A, Sen PC, Ghose AC. 2003. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis is associated with an impairment of protein kinase C activity in their lymphocytes that

can be partially reversed by okadaic acid or anti-transforming growth factor  $\beta$  antibody. *Infection and Immunity*, **71**: 2439-2446.

- Moreira ESA, Araujo Soares RM de, Petrillo-Peixoto ML. 1995. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitology Research*, **81**: 291-295.
- Moreno J, Nieto J, Chamizo C, González F, Blanco F, Barker DC, Alvar J. 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after chemotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **71**: 181-195.
- Mukherjee P, Ghosh AK, Ghose AC. 2003. Infection pattern and immune response in the spleen and liver of Balb/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. *Immunological Letters*, **86**: 131-138.
- Mukhopadhyay S, Sen P, Bhattacharyya S, Majumdar S, Roy S. 1999. Immunoprophylaxis and immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, **17**: 291-300.
- Mullen AB, Baillie AJ, Carter KC. 1998. Visceral leishmaniasis in the Balb/c mouse: A comparison of the efficacy of a nonionic surfactant formulation of sodium stibogluconate with those of three proprietary formulations of Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 2722-2725.
- Mullen AB, Carter KC, Baillie AJ. 1997. Comparison of the efficacies of various formulations of Amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 2089-2092.
- Muller I, Kropf P, Louis JA, Milon G. 1994. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, **62**: 2575-2581.
- Murray HW, Brooks EB, DeVecchio JL, Heinzl FP. 2003. Immunoenhancement combined with amphotericin B as treatment for experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 2513-2517.
- Murray HW, Delph-Etienne S. 2000. Role of endogenous gamma interferon and macrophage microbial mechanism in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **68**: 288-293.
- Murray HW, Harisprasad J, Fichtl RE. 1993. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell deficient host: response to Amphotericin B and Pentamidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 1504-1505.
- Murray HW, Masur H, Keithly JS. 1982. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *The Journal of Immunology*, **129**: 344-350.
- Murray HW, Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF. 1993. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **151**: 929-938.
- Murray HW, Montelibano C, Peterson R, Sypek JP. 2000. Interleukin 12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, **182**: 1497-1502.
- Murray HW. 2000. Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and-independent regulation. *Infection and Immunity*, **68**: 6294-6299.
- Murray HW. 2000. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *International Journal of Infectious Diseases*, **4**: 158-177.
- Murray HW. 2001. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 2185-2197.

## N:

- Nair MP, Schwartz SA. 1982. Immunomodulatory effects of amphotericin B on cellular toxicity of normal human lymphocytes. *Cellular Immunology*, **70**: 287-300.

## Bibliografía

- Nelson BJ, Ralph P, Green SJ, Nacy. 1991. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Journal of Immunology*, **146**: 1849-1857.
- Nickol AD, Bonventre PF. 1985. Immunosuppression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. *Parasite Immunology*, **7**: 439-449.
- Nickol AD, Bonventre PF. 1985. Visceral leishmaniasis in congenic mice of susceptible and resistant phenotypes: immunosuppression by adherent spleen cells. *Infection and Immunity*, **50**: 160-168.
- Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. 2002. Real-Time PCR for detection and quantification of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 1666-1669.
- Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **67**: 117-130.
- Novoa C, Garcia P, Rollan E, González JL. 1990. Amiloidosis in adrenal glands of hamsters experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Histology and Histopathology*, **5**: 225-229.

## O:

- O'Daly JA, Cabrera Z. 1986. Serum protein from *Leishmania brasiliensis* infected hamsters that suppress lymphocyte response of normal hamsters lymphocytes. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, **72**: 293-298.
- Oliva G, Gradoni L, Ciaramella P, de Luna R, Cortese L, Orsini S, Davidson RN, Persechino A. 1995. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **36**: 1013-1019.
- Oliva G. 2000. Treatment of canine leishmaniasis (CANL) in Italy. Focus on liposomal Amphotericin B (AmBisome). En: Canine leishmaniasis: treatment and follow-up. *Cost B9 Expert Meeting*. Madrid, October 20-21, 2000.
- Oliveira AV, Rossi MA, Roque-Barreira MC, Sartori A, Campos-Neto MC. 1985. The potential role of *Leishmania* antigens and immunoglobulins in the pathogenesis of glomerular lesions of hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **79**: 539-543.
- Olliaro PL, Bryceson ADM. 1993. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today*, **9**: 323-328.
- OMS. 1984. The leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series, No. 701*. WHO, Génova.
- OMS. 1990. The control of leishmaniasis: report of an expert committee. *WHO Technical Report Series, No. 793*. WHO, Génova.
- OMS. 2000. Leishmania/HIV co-infection south-western Europe 1990-1998; WHO/LEISH/2000, 42. Geneva: World Health Organization.
- Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL. 2003. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunology*, **25**: 139-148.
- Otero AC, Piuvezam MR, Cunha JMT, Bunn-Moreno MM, Madeira ED. 1993. Cyclophosphamide blocks both antigen-specific and polyclonal immunoglobulin responses in experimental visceral leishmaniasis. *International Journal of Immunopharmacology*, **15**: 255-259.
- Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJ, Storm G. 1997. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1328**: 261-72.
- Overath P, Aebischer T. 1999. Antigen presentation by macrophages harbouring intravesicular pathogens. *Parasitology Today*, **15**: 325-332.

## P:

- Pan AA, Duboise M, Eperon S, Rivas L, Hodgkinson V, Traub-Cseko Y y col. 1993. Developmental life cycle of *Leishmania*: cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes: *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**: 213-223.
- Paul M, Durand R, Fessi H, Rivollet D, Houin R, Astier A, Deniau M. 1997. Activity of a new liposomal formulation of Amphotericin B against two strains of *Leishmania infantum* in a murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 1731-1734.
- Pavanetto F, Genta I, Giunchedi P, Conti B, Conte U. 1994. Spray-dried albumin microspheres for the intra-articular delivery of dexamethasone. *Journal of Microencapsulation*, **11**: 445-54.
- Pearson RD y Queiroz-Sousa A. 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, **22**: 1-13.
- Pearson RD, Evans T, Wheler DA. 1986. Humoral factors during South American visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**: 465-468.
- Pérez H, Labrador F, Torrealba JW. 1979. Variations in the response of 5 strains of mice of *Leishmania mexicana*. *International Journal for Parasitology*, **9**: 27-32.
- Perfect JR, Granger DL, Durack DT. 1987. Effects of antifungal agents and gamma-interferon on macrophage cytotoxicity for fungi and tumor cells. *The Journal of Infectious Diseases*, **156**: 316-323.
- Peters W y Killick-Kendrick R, 1987. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1 y 2. (ed.). Academic Press, London.
- Petit C, Yardley V, Gaboriau F, Bolard J, Croft SL. 1999. Activity of a heat-induced reformulation of Amphotericin B deoxycholate (Fungizone) against *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 390-392.
- Petrillo-Peixoto ML, Beverly SM. 1987. *In vitro* activity of sulfonamides and sulfones against *Leishmania major* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **31**: 1575-1578.
- Pimenta PFP, Saraiva EMB, Sacks DL. 1991. The fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, **72**: 191-204.
- Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VPMG, Gebhard D, del Real G, Ruitenber EJ. 1995. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology*, **25**: 1594-1600.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenhaar J, Bernardina W, del Real G, Ruitenber J. 1994. Cellular and Humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, **62**: 229-235.
- Pinelli E, Rutten VPMG, Bruysters M, Moore P, Ruitenber EJ. 1999. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T cell proliferation and gamma interferon production. *Infection and Immunity*, **67**: 237-243.
- Pinelli E, van der Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenber EJ, Bernadina W, Rutten VPMG. 1999. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **69**: 121-126.
- Pinelli E, van der Kaaj SY, Rutten VPMG, Ruitenber EJ. 1997. Cytokines in a canine model of visceral leishmaniasis. Strategies for the induction of protective immunity. *Cytokines in Infectious diseases/Sepsis and shock*, p. 144.
- Piñero J, Martínez E, Pacheco R, Aragón Z, De Armas F, Del Castillo A, Valladares B. 1999. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, **73**: 21-29.
- Preston PM, Dumonde DC. 1976. Experimental cutaneous leishmaniasis V: Protective immunity in subclinical and selfhealing infection in the mouse. *Clinical and Experimental Immunology*, **23**: 126-138.

## Bibliografia

- Puentas SM, da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA. 1991. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5-9. *Journal of Immunology*, **145**: 4311-4416.
- Puri A, Saxena RP, Sumati P, Guro PY, Kulshreshtha DK, Saxena KD, Dhawan BN. 1992. Immunostimulant activity of Picroliv, the iridoid glycoside fraction of *Picrorhiza kurroa*, and its protective action against *Leishmania donovani* infection in hamsters. *Planta Medica.*, **58**: 528-32.

## Q:

- Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, **183**: 1421-1424.

## R:

- Rabanal RM, Ferrer L, Else RW. 1995. Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **47**: 13-23.
- Ramos H, Attias de Muricano A, Cohen BE, Bolard J. 1989. The polyene antibiotic amphotericin B acts as a Ca<sup>2+</sup> ionophore in sterol-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **42**: 97-102.
- Reiner NE, Ma, NgW, McMaster WR. 1988. Kinetics of gamma-interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 4330-4334.
- Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C. 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **76**: 269-281.
- Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, **81**: 173-184.
- Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL. 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **71**: 69-76.
- Riça-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, Campino L. 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitology Research*, **89**: 163-169.
- Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrió J, Alberola J, Arboix M. 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, **84**: 33-47.
- Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. 1995. *In vivo* antileishmanial properties of tri and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 1234-1239.
- Rodrigues V Jr, da Silva JS, Campos-Neto A. 1992. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *L. donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasite Immunology*, **14**: 49-58.
- Rodrigues V Jr, da Silva JS, Campos-Neto A. 1998. Transforming growth factor  $\beta$  and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **66**: 1233-1236.
- Rondanelli EG, Scaglia M. 1993. *Atlas of Human Protozoa*. Masson S.p.A. Milano.
- Ross R. 1903. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *British Medical Journal*, **2**: 1261-1401.
- Rubin SI, Krawiec DR, Gelberg H, Shanks RD. 1989. Nephrotoxicity of amphotericin B in dogs: a comparison of two methods of administration. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **53**: 23-28.
- Russell DG, Talamas-Rohana P. 1989. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunology Today*, **10**: 328-333.

- Russell DG, Xu S, Chakraborty P. 1992. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *Journal of Cell Science*, **103**: 1193-1210.

## S:

- Sacks DL, Perkins PV. 1984. En: Alvar J, 2001. *Las leishmaniasis: de la biología al control* (2ª ed.). Gráficas Varona, 37008 Salamanca.
- Sacks DL, Perkins PV. 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34**: 456-459.
- Saha B, Das G, Vohra H, Ganguly NK, Mishra CG. 1995. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell mediated immunity. *European Journal of Immunology*, **25**: 2492-2498.
- Sánchez-Brunete Santos JA. 2003. Microesferas con anfotericina B para el tratamiento de la leishmaniosis visceral. Tesis Doctoral. Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. UCM.
- Santos-Gomes G, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romao P, Silveira H. 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **88**: 21-30.
- Sarthou P, Primi D, Cazenave PA. 1986. B cell triggering properties of a non-toxic derivate of amphotericin B. *Journal of Immunology*, **137**: 2156-2161.
- Sartori A, Kaneno R, Baruzzi N, Peracoli MTS. 1999. Increased NK activity does not prevent progression of experimental kala-azar. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **41**: 215-219.
- Sartori A, Roque Barreira MC, Coe J, Campos-Neto A. 1991. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar II: detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani*-infected hamsters. *Clinical and Experimental Immunology*, **87**: 386-392.
- Sartori A, Viana de Oliveira A, Roque-Barreira MC, Rossi MA, Campos-Neto A. 1987. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasite Immunology*, **9**: 93-103.
- Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. 1995. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infection and Immunity*, **63**: 4894-4899.
- Savoia D, Vulcano F, Biglino S, Zucca M. 1991. Evaluation of different assay techniques to assess the interaction between *Leishmania major* and *L. infantum* promastigotes and U937 cells. *Microbios.*, **66**: 73-81.
- Scharton-Kersten T, Scott P. 1995. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, **57**: 515-522.
- Schindler JJ, Warren RP, Allen SD, Jackson MK. 1993. Immunological effects of amphotericin B and liposomal amphotericin B on splenocytes from immune-normal and compromised mice *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 2716-2721.
- Schlein Y, Jacobson RL. 1994. Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of sandflies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **50**: 20-27.
- Scorza JV y cols. 1979; en: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. Peters W, Killick-Kendrick R (ed.). Academic Press, London.
- Scott P, Eaton A, Gause WC, di Zhou X, Hondowicz B. 1996. Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, **84**: 178-187.
- Seaman J, Boer C, Wilkinson R, de Jong J, de Wilde E, Sondorp E, Davidson R. 1995. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. *Clinical Infectious Diseases*, **21**: 188-193.

## Bibliografía

- Shaw JJ. 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**: 471-78.
- Sinke JD. 1997. Immunophenotyping of skin in infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **52**: 13-23.
- Slappendel RJ, Teske E. 1997. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime®) in dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Quarterly*, **19**: 10-13.
- Slappendel RJ, Teske E. 1999. A review of canine leishmaniosis presenting outside endemic areas. In: Killick-Kendrick R (Ed.), Proceedings of the international canine leishmaniosis forum. Canine leishmaniosis: an update. Barcelona, Spain, 1999. Hoechst Roussel Vet., Germany, pp. 54-59.
- Slappendel RJ. 1988. Canine Leishmaniasis. A Review based on 95 cases in the Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, **10**: 1-16.
- Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *Journal of Infectious Diseases*, **154**: 76-83.
- Solano-Gallego L, Llul J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, **90**: 37-45.
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. 2001. *Leishmania-infantum* specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology*, **96**: 265-276.
- Solbach W, Laskay T. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology* **74**: 275-317. En: Alvar J y Moreno J. 2002. *Trends in Parasitology*, **18**: 399-405.
- Squires KE, Schreiber RD, McElrath MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. 1989. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN- $\gamma$  in host defense and tissue granulomatous response. *Journal of Immunology*, **143**: 4244-4249.
- Srivastava JK, Misra A, Sharma P, Srivastava B, Naik S, Dube A. 2003. Prophylactic potential of autoclaved *Leishmania donovani* with BCG against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology*, **127**: 107-114.
- Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. 1996. Reactivation of latent leishmaniosis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*, **183**: 1501-1514.
- Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*, **180**: 783- 793.
- Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. 1988. Role of L3T4+ and LYT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **140**: 3971-3977.
- Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. 1992. Lipid complexing decreases amphotericin B inflammatory activation of human neutrophils compared with that of a deoxycholate-suspended preparation of amphotericin B (Fungizone). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 39-45.
- Sundar S, Agrawal G, Rai M, Makharia MK, Murray HW. 2001. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomised trial. *British Medical Journal*, **323**: 419-22.
- Sundar S, Agrawal G, Sinha PR, Horwith GS, Murray HW. 1997. Short course low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. *Annals of Internal Medicine*, **127**: 133-137.
- Sundar S, Goyal AK, Mandal AK, Makharia MK, Singh VP, Murray HW. 1999. Amphotericin B lipid complex in the management of antimony-unresponsive Indian visceral Leishmaniasis. *The Journal of the Association of Physicians of India*, **47**: 186-188.

- Sundar S, Goyal AK, More DK, Singh MK, Murray HW. 1998. Treatment of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with ultra-short courses of amphotericin-B-lipid complex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **92**: 755-764.
- Sundar S, Gupta LB, Rastogi V, Agrawal G, Murray HW. 2000. Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**: 200-204.
- Sundar S, Jha T, Thakur C, Mishra M, Buffels R. 2000. *Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 23.
- Sundar S, Murray HW. 1996. Cure of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with amphotericin B lipid complex (ABLC). *Journal of Infectious Diseases*, **173**: 762-766.
- Sundar S. 2001. Treatment of visceral leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, **190**: 89-92.
- Syriopoulou V, Daikos GL, Theodoridou M, Pavlopoulou I, Manolaki AG, Sereti E, Karamboulas A, Papathanasiou D, Krikos X, Saroglou G. 2003. Two doses of a lipid formulation of amphotericin B for the treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, **36**: 560-566.

## T:

- Tancrede P, Barwicz J, Jutras S, Gruda I. 1990. The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1030**: 289-95.
- Thakur CP, Pandey AK, Sinha GP, Roy S, Behbehani K, Olliaro P. 1996. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**: 319-322.
- Thakur CP, Singh RK, Hassan SM, Kumar R, Narain S, Kumar A. 1999. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer models of administration and precautions: a study of 938 cases. *Transactional Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**: 319-323.
- Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology*, **7**: 545-555.

## U:

- United States Pharmacopoeia 24. National Formulary 19. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 2000.

## V:

- Valladares JE, Alberola J, Esteban M, Arboix M. 1996. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *The Veterinary Record*, **138**: 181-183.
- Valladares JE, Ruiz de Gopegui R, Riera C, Alberola J, Gallego M, Espada Y, Portús M, Arboix M. 1998. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science*, **64**: 195-198.
- Vasconcellos RCS, Urago KP, Bunn-Moreno MM, Madeira ED. 1996. Suppressor activity in *Leishmania donovani* infected hamsters serum: reversion by delipidated bovine serum albumin and role in cell cycle events. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **29**: 615-622.
- Vecchiarelli A, Verducci G, Perito S, Pucetti P, Marconi P, Bistoni F. 1986. Involvement of host macrophages in the immunoadjuvant activity of amphotericin B in a mouse fungal infection model. *The Journal of Antibiotics*, **39**: 846-850.
- Vercammen F, De Dekken R, Kageruka P. 1995. First evaluation of the use of alopurinol as a single drug for the treatment of canine leishmaniasis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **64**: 208-214.

## Bibliografía

- Vercammen F, De Dekken R. 1996. Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis. *The Veterinary Record*, **139**: 264.
- Vercammen F, Fernández-Pérez FJ, del Amo C, Alunda JM. 2002. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Tropica*, **84**: 175-181.
- Viviani MA, Rizardini G, Tortorano AM, Fasan M, Capetti A, Roverselli AM, Gringeri A, Suter F. 1994. Lipid based amphotericin B in the treatment of cryptococcoses. *Infection*, **22**: 137-142.
- Vouldoukis I, Becherel P, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. 1997. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *European Journal of Immunology*, **27**: 860-865.

## W:

- Wakil AE, Wang ZE, Ryan JC, Fowell DJ, Locksley RM. 1998. Interferon-gamma derived from CD4+ T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *Journal of Experimental Medicine*, **188**: 1651-6.
- Walker S, Taylor SAN, Lee M. 1998. Amphotericin B in lipid emulsion: stability, compatibility, and *in vitro* antifungal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 762-766.
- Walls EV, Key JE. 1982. Inhibition of proliferation of a murine myeloma cell line and mitogen-stimulated B lymphocytes by the antibiotic amphotericin B (Fungisone). *Immunology*, **47**: 115-121.
- Walter E, Dreher D, Kok M, Thiele L, Kiama SG, Uer P, Merkle HP. 2001. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *Journal of Controlled Release*, **76**: 149-68.
- Weiss DJ. 2001. Evaluation of monoclonal antibodies for identification of subpopulations of myeloid cells in bone marrow obtained from dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **62**: 1229-1233. En: Alvar J y Moreno J. 2002. *Trends in Parasitology*, **18**: 399-405.
- Willians DL. 1997. Studies on canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology. *Veterinary Journal*, **153**: 31-39.
- Wilson ME, Sandor M, Blum AM, Young BM, Metwali A, Elliot D, Lynch RG, Weinstock JV. 1996. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *Journal of Immunology*, **156**: 2231-2239.
- Wolf JE, Masoff SE. 1990. *In vivo* activation of macrophages oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. *Infection and Immunity*, **58**: 1296-1300.

## Y:

- Yamaguchi H, Abe S, Tokuda Y. 1993. Immunomodulating activity of antifungal drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **685**: 447-457.
- Yardley V, Croft SL. 2000. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **13**: 243-248.

## Z:

- Zehra K, Anuradha RP, Rizvi SY, Haq W, Kundu B, Katiyar JC, Mathur KB. 1995. *Leishmania donovani* in hamsters: stimulation of non specific resistance by novel lipopeptides and their effect in antileishmanial therapy. *Experientia*, **51**: 725-30.