

**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Dpto. de Patología Animal II**

**TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA:
VALORACION, CARACTERIZACION Y COMPARACION
DE LA RESPUESTA A DISTINTOS PROTOCOLOS
A BASE DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINE
(ASOCIADO O NO A ALOPURINOL)**

TESIS DOCTORAL

**INMACULADA AMUSATEGUI
Madrid, 1998**

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR

Reunido el Tribunal axaminador, constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis doctoral, que habia escrito libremente sobre el siguiente tema:

Tratamiento de la ley unificada sobre el seguro (revisión - comparación de la ley y la ley anterior a su d. ant. manifiesto de cumplimiento (correcto o no calificado))

Ha sido dirigida por: *Prof. Dr. Rafael S. Torralba*

Terminada la lectura y contestadas por el tesando las objeciones formuladas por los Sres. Miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de: *APT O CON LAUDE PZ (ORDINADO)*

Madrid, 23 de Mes de 1958

EL PRESIDENTE LOS VOCALES EL SECRETARIO

[Handwritten signatures and initials]
The block contains several handwritten signatures and initials. On the left, there is a signature that appears to be 'Francisco'. In the center, there are two more signatures, one above the other, with a horizontal line underneath the second one. To the right, there are initials 'ALS'. At the bottom right, there is a large, stylized signature or mark.

**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Dpto. de Patología Animal II**

**TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA:
VALORACION, CARACTERIZACION Y COMPARACION
DE LA RESPUESTA A DISTINTOS PROTOCOLOS
A BASE DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINE
(ASOCIADO O NO A ALOPURINOL)**

El director del trabajo:

Dr. D. Miguel Angel Tesouro Díez



Memoria presentada por:

Inmaculada Amusategui
para optar al grado de Doctor

Madrid, 1998

*A Jesús
a mis padres,
a mis hermanos
y a mis sobrinas*

*A la memoria de mi
querida amiga Sonia*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

- Al director de la presente memoria, Dr. D. Miguel Angel Tesouro Díez, por su apoyo y dedicación permanentes. De él partieron tanto la idea como el diseño y la orientación de este trabajo.

- Al Dr. D. Manuel Rodríguez Sánchez, Decano de la Facultad de Veterinaria de Madrid, por el interés mostrado y el seguimiento continuo del trabajo desde su inicio.

- A la Dra. Dña. María Castaño Rosado, Directora del Departamento de Patología Animal II, por su apoyo y confianza.

- A D. Francisco José Fernández Pérez, del Departamento de Patología Animal I, por su total disponibilidad en los momentos en los que he necesitado su ayuda y, particularmente, por la realización de las pruebas de proliferación linfocitaria.

- Al Dr. D. Angel Sainz y al Dr. D. Francisco Mazzucchelli por su participación directa en la ejecución de este trabajo, tanto en los aspectos técnicos como en los formales.

- Al Dr. D. Fernando Rodríguez Franco por su apoyo incondicional en todo momento.

- A D. Constantino Rodríguez Pérez por su minuciosa labor en el Servicio de Diagnóstico y Control de la Leishmaniosis Canina. Su constancia y dedicación facilitaron el manejo de la gran cantidad de datos y muestras que fueron necesarios para la realización del presente trabajo.

- Al Dr. D. Pedro Cuesta, del Centro de Proceso de Datos de esta Universidad, por su inestimable ayuda en el proceso e interpretación de los análisis estadísticos.

- A todos los miembros del Departamento de Patología Animal II y muy especialmente al equipo del Laboratorio de Biopatología, por su ayuda en la realización de las determinaciones analíticas, y a mis compañeros de la Clínica de Pequeños Animales que con su labor aportaron los datos a partir de los cuales se llevó a cabo el estudio retrospectivo.

- A Dña. Rosa Gonzalo Daganzo, del Centro Nacional de Biotecnología, por su colaboración facilitando buena parte de la bibliografía consultada e incluida en esta memoria.

- A mi hermana Edi por prestarse a traducir al español las publicaciones en alemán y en italiano.

Finalmente, a todas las personas que, de manera directa o indirecta, han hecho posible la realización del presente trabajo.

INDICE

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS **1**

REVISION BIBLIOGRAFICA **5**

ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA	7
INMUNOPATOLOGIA	11
CUADRO CLINICO	17
BIOPATOLOGIA	23
DIAGNOSTICO	26
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y CONCURRENCIAS	31
TRATAMIENTO	32
ANTIMONIALES	32
Antimoniato de meglumine y estibogluconato sódico	33
DIAMIDINAS	45
Pentamidina	45
ANTIBIOTICOS DERIVADOS DE LOS POLIENOS	47
Anfotericina B	47
OTROS ANTIBIOTICOS	51
Aminosidina	51
DERIVADOS DEL IMIDAZOL	52

ANALOGOS DE LAS PURINAS (PIRAZOLOPIRIMIDINAS)	53
Alopurinol	54
AGENTES TERAPEUTICOS EN INVESTIGACION	58
INMUNOMODULADORES	60
- INMUNOSUPRESORES	60
Prednisona/Prednisolona	61
- INMUNOESTIMULANTES	64
Levamisol	65
Citoquinas	67
Otros inmunoestimulantes	70
VECTORES DE MEDICAMENTOS	71
Liposomas	72
Otros vectores de medicamentos	75
TRATAMIENTOS DE APOYO	76
PRONOSTICO E INSTAURACION DEL TRATAMIENTO	78
CONTROL DEL TRATAMIENTO	81
PROFILAXIS	85
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	87
ESTUDIO RETROSPECTIVO	89

ESTUDIO PROSPECTIVO.....	93
ANALISIS DE LOS DATOS.....	96

RESULTADOS **99**

ESTUDIO RETROSPECTIVO.....	101
R.I - DESCRIPCION DE LA MUESTRA.....	101
R.II - RESPUESTA A CORTO PLAZO.....	102
R.II.A -. Tipo de tratamiento/Respuesta a corto plazo.....	102
R.II.B -. Fase de la enfermedad/Respuesta a corto plazo.....	104
R.II.C -. Edad/Respuesta a corto plazo.....	107
R.II.D -. Sexo/Respuesta a corto plazo.....	109
R.III - EVOLUCION DE LOS CASOS CLINICOS.....	111
R.III.A -. Evolución hacia la no remisión.....	111
R.III.A.1 -. Evolución hacia el agravamiento.....	112
R.III.A.2 -. Evolución hacia el mantenimiento.....	113
R.III.B -. Evolución hacia la remisión.....	114
R.IV - EVOLUCION DE LOS CASOS QUE REMITIERON.....	117
R.IV.A -. Recidivas.....	117
R.IV.B -. Periodos de remisión.....	122
R.IV.C -. Evolución de los casos que presentaron recidiva.....	126
R.V - EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS.....	129
R.V.A -. Evolución del título de anticuerpos.....	129
R.V.B -. Evolución del cociente Albúmina/Globulinas.....	132

ESTUDIO PROSPECTIVO.....	134
P.I - DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DE LA MUESTRA.....	134
P.I.A - Descripción.....	134
P.I.A.1 -. Variables nominales.....	134
P.I.A.2 -. Variables continuas.....	138
P.I.B -. Caracterización.....	144
P.I.B.1 -. Relaciones de las variables nominales.....	144
P.I.B.2 -. Correlaciones entre las variables continuas.....	149
P.II - RESPUESTA A CORTO PLAZO.....	151
P.II.A -. Efectos colaterales al tratamiento.....	152
P.II.B -. Tipo de tratamiento/Respuesta a corto plazo.....	154
P.II.C -. Fase de la enfermedad/Respuesta a corto plazo.....	155
P.II.D -. Edad y sexo/Respuesta a corto plazo.....	156
P.III - EVOLUCION DE LOS CASOS CLINICOS.....	157
P.III.A -. Evolución hacia la no remisión.....	158
P.III.A.1 -. Evolución hacia el agravamiento.....	158
P.III.A.2 -. Evolución hacia el mantenimiento.....	160
P.III.B -. Evolución hacia la remisión.....	161
P.IV - EVOLUCION DE LOS CASOS QUE REMITIERON.....	168
P.IV.A -. Recidivas.....	168
P.IV.A.1 -. Caracterización de la recidiva.....	171
P.IV.B -. Periodos de remisión.....	173
P.IV.C -. Evolución de los casos que presentaron recidiva.....	176
P.V - EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS.....	178
P.V.A -. Evolución del título de anticuerpos.....	178
P.V.B -. Evolución del cociente Albúmina/Globulinas.....	180

P.V.C - Evolución de los parámetros biopatológicos en función de distintas variables nominales.....	182
P.V.C.1 - Evolución de los parámetros biopatológicos en función de la fase, de la respuesta a corto plazo y de la presentación o no de recidiva.....	188
P.VI – VALORACION PREDICTIVA DE LA RESPUESTA TERAPEUTICA.....	217
P.VI.A -. Probabilidad de Remisión sí/Remisión no.....	218
P.VI.B -. Probabilidad de respuesta a corto plazo Favorable/Muy Favorable.....	219
P.VI.C -. Probabilidad de Efectos Colaterales no / Efectos Colaterales sí.....	220
P.VI.D -. Probabilidad de Un Ciclo/Más de Un Ciclo de tratamiento hasta la remisión.....	221
P.VI.E -. Probabilidad de Recidiva sí/Recidiva no.....	222
<i>DISCUSION</i>	225
I - DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DE LAS MUESTRAS.....	227
I.A -. Descripción.....	227
I.B -. Caracterización.....	231
II - DESCRIPCION DE LOS TRATAMIENTOS.....	232
III - RESPUESTA A CORTO PLAZO.....	234
III.A -. Efectos colaterales al tratamiento.....	235
III.B -. Comparación de la respuesta a corto plazo.....	237

IV - EVOLUCION DE LOS CASOS CLINICOS.....	239
IV.A -. Evolución hacia el agravamiento.....	240
IV.B -. Evolución hacia el mantenimiento.....	242
IV.C -. Evolución hacia la remisión.....	244
V - EVOLUCION DE LOS CASOS QUE REMITIERON.....	248
V.A -. Recidivas.....	248
V.B -. Periodos de remisión.....	254
V.C -. Evolución de los casos que presentaron recidiva.....	262
VI - EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS.....	264
VIA -. Evolución del título de anticuerpos.....	265
VLB -. Evolución del cociente Albúmina/Globulinas.....	267
VLC -. Evolución de otros parámetros.....	268
VII – VALORACION PREDICTIVA DE LA RESPUESTA TERAPEUTICA.....	269

<u>CONCLUSIONES</u>	275
----------------------------	------------

<u>RESUMEN</u>	279
-----------------------	------------

<u>SUMMARY</u>	283
-----------------------	------------

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	287
----------------------------	------------

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Siendo la leishmaniosis canina un proceso patológico ampliamente estudiado, relativamente bien conocido y bastante consensuado en aspectos tales como su epidemiología, su clínica y su diagnóstico, paradójicamente la disparidad de protocolos utilizados para su tratamiento es enorme, a pesar de que el número de fármacos específicos sea muy reducido. Probablemente la causa fundamental de esta diversidad de pautas terapéuticas sea la ausencia de un tratamiento realmente efectivo y definitivo que permita la curación completa de los enfermos. Otro aspecto a tener en cuenta, en este sentido, es el curso crónico y extremadamente variable de la enfermedad tanto en su patocronia como en la evolución durante y después del tratamiento que, junto con la dificultad añadida que supone la necesidad de contar con la colaboración permanente de los propietarios, limita en gran medida la obtención de resultados detallados y precisos.

Por todos estos motivos, multitud de clínicos veterinarios de nuestro país, a pesar de contar con una amplia experiencia a la hora de predecir y contestar cuestiones relacionadas con el porvenir de los perros leishmaniósicos sometidos a terapia, se mueven más en el campo de las apreciaciones personales y suposiciones que en las bases de unos resultados bien contrastados por métodos bioestadísticos.

Entre la extensa bibliografía disponible sobre esta enfermedad sucede algo parecido. Muchas son las publicaciones en las que se aportan datos relativos al tratamiento de la leishmaniosis canina. Sin embargo, en la mayoría se trabaja sobre aspectos aislados de la evolución post-terapéutica o sobre casos individuales que, a menudo, no proporcionan conclusiones precisas y validadas mediante modelos estadísticos.

Conscientes de esta situación, nos planteamos la realización del presente trabajo con el que, aplicando la bioestadística (herramienta que faculta a las ciencias biológicas para establecer sus conclusiones basándose en la variabilidad de los sucesos y en el cálculo de probabilidades) pretendíamos dar respuesta a las cuestiones relativas al tratamiento que se plantean ante un caso de leishmaniosis, por un lado, analizando la experiencia acumulada en nuestro Departamento y, por otro, valorando la eficacia del Glucantime® administrado por una vía hasta entonces escasamente utilizada, la vía subcutánea.

Los objetivos concretos que nos propusimos para el primer estudio (retrospectivo) fueron los siguientes:

- Describir, valorar y comparar la respuesta terapéutica a corto (muy favorable, favorable, nula o desfavorable), medio (remisión sí o remisión no) y largo (recidiva sí o recidiva no) plazo obtenida con los distintos protocolos (a base de Glucantime®) empleados en las consultas de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

- Valorar la posible influencia en esta respuesta de la edad, del sexo y del grado de afección del animal (representado por la fase de la enfermedad) en el momento del diagnóstico.

- Determinar la frecuencia de recidiva y estimar el tiempo medio de presentación de las mismas.

- Analizar y valorar los tiempos de permanencia en remisión, en función del tratamiento recibido, en aquellos perros que no presentan recidiva.

- Estudiar la evolución de los dos parámetros biopatológicos más utilizados en el control y seguimiento post-terapia: título de anticuerpos y cociente albúmina/globulinas, calculando las ecuaciones de las curvas que más se ajustan a la dinámica de dichos parámetros.

Los objetivos del ensayo clínico (estudio prospectivo) fueron:

- Valorar la respuesta terapéutica observada a corto, medio y largo plazo tras la administración subcutánea de Glucantime® y comparar estos resultados con los obtenidos al emplear la vía intramuscular.

- Caracterizar la respuesta terapéutica a corto, medio y largo plazo en función de los datos clínicos y biopatológicos obtenidos en el momento del diagnóstico.

- Valorar y comparar las tasas de permanencia en remisión en función del tratamiento recibido y de otras variables cualitativas.

- Estudiar la evolución de los distintos parámetros biopatológicos en los animales que alcanzan la remisión comparando sus valores en distintos momentos del seguimiento y en función de la fase de la enfermedad, de la respuesta a corto plazo y de la presentación o no de recidiva .

- Determinar las posibles variables que actúan como factores de riesgo en el porvenir de los casos tratados cuantificando su influencia en la respuesta terapéutica a corto, medio y largo plazo.

REVISION BIBLIOGRAFICA

ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

La leishmaniosis es una enfermedad con una amplia distribución en las áreas templadas, subtropicales y tropicales de nuestro planeta, que afecta al hombre y a los animales (OMS, 1993). Está causada por microorganismos protozoarios difásicos pertenecientes al Phylum Sarcomastigophora, clase Zoomastigophorea, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género *Leishmania* (Schmidt *et Roberts*, 1985; Soulsby, 1987).

Existen distintas especies de *Leishmania* en diversas zonas del Viejo y del Nuevo Mundo responsables de diferentes formas clínicas de leishmaniosis, estimándose la población de riesgo en 400 millones de personas (Ashford *et al*, 1992) y la incidencia anual en unos 2 millones de casos nuevos (de los que tan sólo 600.000 son declarados oficialmente) (OMS, 1993). La mayoría de las leishmaniosis responden a ciclos zoonóticos y, en pocos casos, antroponóticos (OMS, 1990).

La clasificación del género *Leishmania* y la nomenclatura de las distintas especies y serotipos es extremadamente compleja y confusa. Tradicionalmente se había basado en la distribución geográfica, síntomas clínicos y serología (Marinkelle *et Rodriguez*, 1981; Slappendel *et Greene*, 1990). Según estos criterios taxonómicos las principales especies que afectan al hombre quedarían resumidas en el siguiente cuadro (Zuckerman *et Lainson*, 1977):

HEMISFERIO ESTE (VIEJO MUNDO)		HEMISFERIO OESTE (NUEVO MUNDO)	
<i>L.donovani</i>	leishmaniosis visceral	<i>L.chagasi</i>	leishmaniosis visceral
<i>L.infantum</i>	leishmaniosis visceral	<i>L.braziliensis</i>	leishmaniosis mucocut.
<i>L.tropica</i>	leishmaniosis cutánea	<i>L.mexicana</i>	leishmaniosis cutánea
<i>L.major</i>	leishmaniosis cutánea	<i>L.peruviana</i>	leishmaniosis cutánea
<i>L.aethiopica</i>	leishmaniosis cutánea		

Tales criterios de clasificación determinaron que, hasta entrada la década de los ochenta, en los países de la cuenca mediterránea se distinguieran dos especies de *Leishmania* (Gil Collado, 1977; Quiles *et al*, 1979; Sierra, 1981; Rodríguez *et al*, 1981; Tzamouranis *et al*, 1984; Garifallou *et al*, 1984; Ministerio de Sanidad y Consumo, 1986): *L.tropica*, causante de la leishmaniosis cutánea o botón de Oriente, y *L.infantum* (llamada indistintamente por algunos *L.donovani* (Lanotte *et al*, 1979; Rodríguez *et al*, 1981; Ministerio de Sanidad y Consumo, 1986) o *L.donovani infantum* (Tzamouranis *et al*, 1984; Garifallou *et al*, 1984)), causante de la leishmaniosis visceral o kala-azar infantil.

Los métodos de identificación empleados en el presente, análisis electroforético de isoenzimas y análisis de DNA del kinetoplasto (kDNA) mediante enzimas de restricción (Schnur *et al*, 1981; Kreutzer *et al*, 1983; Gramiccia *et al*, 1989; Das Gupta *et al*, 1991) han permitido confirmar la presencia de una única especie de *Leishmania*, *L.infantum*, para las formas viscerales y cutáneas de la enfermedad tanto en España (Alvar *et Ortiz*, 1987; OMS, 1990; Tesouro *et al*, 1991) como en el resto del suroeste de Europa (Rioux *et al*, 1980; Maazoun *et al*, 1981; Kontos *et Spais*, 1989; Gramiccia *et al*, 1989; OMS, 1990; Jiménez *et al*, 1995) donde la leishmaniosis es a menudo diagnosticada en el perro (Grondalen *et Sjerne*, 1994) y, con menor frecuencia, en el hombre (Bussieras, 1977a).

Hasta hace unos años la leishmaniosis visceral afectaba, sobre todo, a niños (Bussieras, 1977a; Vitoria, 1984; Ministerio de Sanidad y Consumo, 1986) particularmente entre 1 y 4 años de edad (Gil Collado, 1977; Cambronero *et al*, 1983; OMS, 1984). En la actualidad se detecta, cada vez más, asociada a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Marty *et Le Fichoux*, 1988; Tremblay *et al*, 1996; Alvar *et al*, 1997) y al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (OMS, 1990; Alvar *et al*, 1997), considerándose el perro como el principal reservorio de esta enfermedad (OMS, 1990).

Su comportamiento dermo o viscerotropo depende de un equilibrio entre la virulencia del parásito (zimodeme) y la respuesta inmunitaria que es capaz de establecer el hospedador (Alvar *et al*, 1995). Zimodeme es una población que difiere de otras de la misma especie o subespecie en una o varias características isoenzimáticas (Miles, 1986). En perros de nuestro país y de otros países del mediterráneo, se han descrito el zimodeme MON-1, abrumadoramente (Alvar *et al*, 1987; Marty *et al*, 1992; Jiménez *et al*, 1995; Dedet *et al*, 1997; Pralong *et al*, 1997) y, de forma excepcional, el MON-27, MON-29, MON-33 (Ferrer, 1997a), MON-77 y MON-105 (Guilvard, 1996).

Mientras que la variabilidad de *L.infantum* en perros y en personas inmunocompetentes es pequeña, en sujetos inmunodeprimidos (VIH positivos) es mucho mayor, lo que ha hecho sugerir dos hipótesis: 1) el sistema inmunitario competente sería capaz de seleccionar cepas virulentas de no virulentas pero, en estado de anergia, todas podrían prosperar y manifestarse (Gradoni *et al*, 1994; Jiménez *et al*, 1995) y 2) la existencia de un patrón antroponótico de leishmaniosis en la que los pacientes infectados que utilizan la vía endovenosa para drogarse serían reservorios potenciales para algunos zimodemes y las jeringas actuarían como vehículo de las células parasitadas (Jiménez *et al*, 1995; Alvar *et al*, 1997).

El perro doméstico, como ya se ha dicho, actúa como **principal reservorio** de *L.infantum* en el litoral mediterráneo (OMS, 1990). Aunque esta especie ha sido aislada de ciertos roedores como el ratón o la rata negra y de cánidos silvestres como el zorro, el lobo o el chacal (Rioux *et al*, 1968; Rioux *et al*, 1971; Bettini *et al*, 1980; Rodríguez *et al*, 1981; Martín-Iniesta *et al*, 1982; Abranches *et al*, 1983; Bourdiseau, 1993; Hervás *et al*, 1996), no se conoce con exactitud si estos animales son capaces, por sí solos, de mantener las poblaciones de parásitos, por lo que su papel como reservorios no se puede precisar (OMS, 1990; Alvar *et al*, 1995).

Los gatos también pueden infectarse con leishmanias mediterráneas pero las referencias de casos clínicos son excepcionales (Pedersen, 1988; Laurelle-Magalon *et Toga*, 1996; Hervás *et al*, 1997).

La leishmaniosis se transmite por pequeños vectores del género *Lutzomya* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (OMS, 1990). Los flebotomos son dípteros nematóceros de pequeña talla (3-5 mm) con el cuerpo jiboso y totalmente cubierto de pelo y de color variable de leonado a oscuro (Gil Collado *et al*, 1989). Solamente las hembras son hematófagas por lo que sólo ellas pueden transmitir el parásito (Franc, 1993; Molina, 1995).

P. perniciosus y *P. ariasi* son los únicos vectores probados de *L. infantum* en nuestro país (Killick-Kendrick, 1990; OMS, 1990; Tesouro *et al*, 1991; Molina, 1995; Guilvard, 1996) siendo el primero el más abundantemente representado en gran parte de la geografía española (Gil Collado, 1977; Molina, 1995; Morillas *et al*, 1996).

P. perniciosus se distribuye por la mayoría de las zonas áridas de la península y *P. ariasi* por regiones más húmedas como Cataluña, Portugal y sur de Francia. La actividad de los flebotomos es crepuscular, iniciándose después de la puesta del sol y prolongándose durante las primeras horas de la noche, siempre y cuando la temperatura sea superior a los 18° C y no haya lluvia ni viento. Una vez alimentadas las hembras vuelan con rapidez a microhábitats húmedos para reposar antes de realizar la ovoposición. La transmisión es rural y periurbana en viviendas en cuyos alrededores abundan los perros y se acumulan basuras, material orgánico en descomposición o escombros que favorecen el ciclo biológico de los vectores (Alvar *et al*, 1995; Molina, 1995).

Aunque experimentalmente se ha constatado la transmisión de *L. infantum* por la picadura de un solo flebotomo (Rioux *et al*, 1979), algunos autores sostienen que el auténtico modo de infección natural se correspondería con infecciones repetidas, donde los perros son más o menos regularmente picados por insectos portadores del agente; al menos, esto es lo que sugieren Pospischil y col (1987) basándose en un ensayo llevado a cabo en perros en el que inoculaciones repetidas del parásito condujeron a pronunciados incrementos en los títulos de anticuerpos (Pospischil *et al*, 1987).

Otras formas de transmisión como, por ejemplo, venérea en el hombre (Symmers, 1960) y en el perro (Riera *et Valladares*, 1996), experimental de perro a hombre (Sinton, 1938), accidente laboratorial (Terry *et al*, 1950), contacto directo con lesiones cutáneas (Harris, 1994), infección congénita tanto en niños (Blanc *et Robert*, 1984; Brabin *et Brabin*, 1992; Sharma *et al*, 1996; Meinecke *et al*, 1997) como en perros (Mancianti *et Sozzi*, 1995), transfusión de sangre (Moss *et Wilson*, 1992; Freitas *et al*, 1997; Singh *et al*, 1997) o a través de jeringas compartidas en pacientes VIH positivos (Jiménez *et al*, 1995; Amela *et al*, 1996; Alvar *et al*, 1997) han sido documentadas o sugeridas, pero sólo de forma ocasional. En cualquier caso, todos los donantes de sangre en zonas enzoóticas deberían ser previamente analizados de esta enfermedad (Kontos *et Koutinas*, 1993), ya que la sangre parasitada permanece infectante al menos 96 horas tras la extracción (Molina *et al*, 1994b).

En lo que se refiere a la infección congénita o a través de la leche materna, en un estudio Berenger (1988) pone de manifiesto que todos los cachorros nacidos de perras enfermas (amamantados o no amantados por ellas) eran seronegativos a los dos meses del nacimiento y los que fueron controlados posteriormente permanecían seronegativos incluso un año después (Berenger, 1988).

En condiciones naturales las leishmanias tienen un **ciclo evolutivo** en el que se alternan una fase intracelular en el hospedador vertebrado (forma amastigote) con una fase extracelular en el insecto vector (forma promastigote) (Schmidt *et Roberts*, 1985).

El hábitat natural del amastigote es el interior de los macrófagos del hospedador vertebrado. El amastigote tiene forma ovalada o redonda de 2-5 μm de diámetro (Zuckerman *et Lainson*, 1977; Schmidt *et Roberts*, 1985), con un núcleo proporcionalmente grande y ligeramente excéntrico, una estructura mitocondrial especializada en forma de barra (kinetoplasto) (Pearson *et Queiroz*, 1996) y un flagelo reducido a una fibrilla totalmente intracitoplasmática situada en la bolsa flagelar (Rodríguez *et al*, 1984).

Cuando el vector se alimenta de animales infectados ingiere las células parasitadas por amastigotes. Al llegar la sangre al tubo digestivo del insecto se produce la liberación de los protozoos por ruptura de los macrófagos y allí se transforman en promastigotes (Schmidt *et Roberts*, 1985). Estos son fusiformes (de 15-25 μm de longitud por 3-4 μm de anchura), tienen un kinetoplasto en posición transversal al eje del flagelo externo (de 15-20 μm de longitud) y presentan un núcleo central (Rodríguez *et al*, 1984).

Los promastigotes se reproducen por fisión binaria invadiendo el intestino del vector y, después de unos días, alcanzan la forma infectiva (metacicloogénesis) (Méndez, 1997) en las porciones anteriores del tracto digestivo (Sacks *et Perkins*, 1984). Mientras tanto el flebotomo requiere una nueva ingesta de sangre y, en el proceso de succión, pasan leishmanias metacíclicas al nuevo hospedador vertebrado (Alvar *et al*, 1995) reiniciándose el ciclo.

Los vectores son activos, fundamentalmente, desde la primavera hasta el otoño. Como su radio de vuelo es limitado, el vector y el reservorio deben vivir en estrecha proximidad con las personas para que éstas lleguen a infectarse (Slappendel *et Greene*, 1990). Esta escasa movilidad de los flebotomos, unida a su heterogénea distribución geográfica, explicaría la existencia de áreas de gran prevalencia junto a otras, a pocos kilómetros, de muy baja prevalencia (Mancianti *et al*, 1986). Por esta misma razón, el desarrollo enzoótico se produciría por un aumento en el número de microfocos y no por expansión de los focos existentes y las tasas de morbilidad de los perros estarían fuertemente ligadas a la distribución y densidad de los vectores (Lanotte *et al*, 1978).

La **distribución geográfica** de casos positivos, por tanto, no es uniforme. En la isla de Elba (Italia), por ejemplo, la seroprevalencia en perros oscila entre el 2.5 y el 39.6%, dependiendo de las comunidades (Mancianti *et al*, 1986), mientras que en el norte de Grecia la prevalencia de leishmaniosis canina se ha situado en el 1.6% (Kontos *et Spais*, 1989). El resultado de una encuesta en los Alpes Marítimos (Francia) reveló una proporción de perros positivos en torno al 12%, de los cuales el 40% eran asintomáticos (Ozon *et al*, 1995).

En España, se diagnostican casos de leishmaniosis canina prácticamente en todo el territorio nacional, siendo el área de Levante y la zona Centro (Madrid) las más afectadas (Tesouro *et al*, 1991).

Centrándonos en nuestra Comunidad Autónoma, en el año 1936, la prevalencia de leishmaniosis canina en Madrid era del 7.9% (Sanchez Botija, 1936), mientras que el porcentaje medio de casos diagnosticados en esta provincia entre 1950 y 1954 fue del 5.2% (González, 1955). Una laguna en la bibliografía separa estas cifras de los datos publicados en el año 1981, en el que Rodríguez y col. notifican un total de 203 perros diagnosticados en la Facultad de Veterinaria de Madrid, en el plazo de 5 años (Rodríguez *et al*, 1981). Esta laguna informativa puede ser justificada por la supuesta regresión de la leishmaniosis canina, indirectamente motivada por la campaña antipalúdica que produjo la casi total desaparición del vector (Rodríguez *et al*, 1984). En 1989 Tesouro y col. realizan un estudio retrospectivo en el que se refleja la evolución de los casos de leishmaniosis canina en la década de los ochenta. Este estudio, realizado sobre población sospechosa, pone de manifiesto un aumento en la proporción de perros afectados desde 1981 (22.39%) hasta 1989 (36.29%) (Tesouro *et al*, 1989).

La infección en la población humana habría seguido una evolución paralela pero con una incidencia mucho menor (Tesouro *et al*, 1989). Otras publicaciones también han puesto de manifiesto este paralelismo (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1986; Acedo *et al*, 1996; Morillas *et al*, 1996). Más recientemente la seroprevalencia (canina) en nuestra Comunidad se ha estimado en el 4.7% (Celaya, 1993), con una incidencia media cercana al 3%, siendo el entorno periurbano el más afectado por la enfermedad (Tesouro *et al*, 1995c; Celaya, 1993). En albergues de la Comunidad de Madrid estas cifras se disparan situándose en una prevalencia de más del 8% (Meana *et al*, 1993; Rupérez *et al*, 1994).

INMUNOPATOLOGIA

Actualmente no todos los fenómenos inmunológicos que acontecen una vez que el parásito es inoculado en el perro, son bien conocidos y entendidos. Sólo a través de los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* podemos hacernos una idea más o menos clara de lo que realmente ocurre en el curso de la leishmaniosis canina (Varela, 1992).

Leishmania ingresa en el hospedador vertebrado, mediante la picadura del flebotomo, en su **forma flagelada (promastigote)** metacíclica (Russell *et Talamas-Rohana*, 1989; Méndez, 1997). La supervivencia del parásito en el hospedador depende de que penetre con éxito en un macrófago y de su transformación en la **forma aflagelada (amastigote)** mucho más resistente (Bourdeau, 1994). Para ello los promastigotes deben interaccionar, mediante sus moléculas de superficie (entre las que destacan, por su mayor abundancia, la glicoproteína gp63 (Russell *et Talamas-Rohana*, 1989; González, 1997) y el lipofosfoglicano (LPG)), con los receptores presentes en la superficie del macrófago. Asimismo, esta unión se atribuye, en parte, a la integrina CR3 que reconoce el fragmento C3bi en la superficie del parásito (Russell *et Talamas-Rohana*, 1989). En el interior de los macrófagos los amastigotes quedan englobados en vacuolas fagocíticas (fagosomas) que se fusionan con los lisosomas para formar fagolisosomas (Bourdeau, 1994) y allí se dividen hasta provocar la lisis celular para, luego, parasitar nuevos macrófagos (Russell *et Talamas-Rohana*, 1989).

En principio, parece que la **resistencia a padecer esta enfermedad** se ha asociado con una fuerte respuesta celular (incluyendo los linfocitos T y las citoquinas que éstos producen) y con la presencia de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, mientras que el desarrollo de una respuesta humoral importante (con alta producción de anticuerpos) estaría relacionado con la **progresión de la enfermedad** (Pearson *et al*, 1983; Killick-Kendrick *et al*, 1994; Pinelli *et al*, 1994a; Pal *et al*, 1995).

Efectivamente, en un estudio sobre la actividad de los linfocitos T y B, Martínez y col.(1993) ponen de manifiesto cómo en el curso de la leishmaniosis canina, se produce una baja respuesta proliferativa de los linfocitos T y una activación de los linfocitos B que se transforman en células plasmáticas y dan lugar a la producción de una gran cantidad de anticuerpos. Estos mecanismos de respuesta se originarían en periodos iniciales de la enfermedad y persistirían en fases más avanzadas (Martínez *et al*, 1993).

Inmunidad celular:

En los últimos años se ha prestado mucha atención al papel que distintas subclases de células T, citoquinas y macrófagos juegan en la respuesta del hospedador a la infección por *Leishmania*. Estos estudios han conducido a la identificación de distintas poblaciones y subpoblaciones de **linfocitos T**.

Particularmente, las investigaciones sobre clones de células T CD4+ en roedores han identificado dos subpoblaciones de **células T helper (Th)**, llamadas tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) que pueden distinguirse funcionalmente y por las citoquinas que producen (Mosmann *et al*, 1986; Cherwinski *et al*, 1987). Asimismo, en diferentes estudios se ha puesto de manifiesto que la resistencia y susceptibilidad a la infección por *Leishmania* están generalmente mediadas por las células Th1 y Th2 respectivamente (Liew *et O'Donnell*, 1993; Kemp, 1997).

Los factores que determinan el predominio de linfocitos Th1 ó Th2 durante los episodios de leishmaniosis no han sido completamente definidos todavía. El tamaño del inóculo infectante (Troter *et al*, 1980; Pearson *et Queiroz*, 1996) y la forma de presentación del antígeno parasitario acompañado del antígeno de histocompatibilidad de clase II, parecen ser importantes en este sentido (Kaye *et Blackwell*, 1989; Liew, 1990a; Hsieh *et al*, 1992; Pearson *et Queiroz*, 1996).

Las células T sólo pueden reconocer el antígeno si éste está asociado a los antígenos de histocompatibilidad de clase I (células T CD8+) y clase II (células T CD4+) localizados en la superficie de las células presentadoras de antígeno (Antczak *et Gorman*, 1992; Alexander *et Russell*, 1992). Así, aunque el macrófago pueda expresar el antígeno parasitario, si falla en la expresión del antígeno de clase II propio, resultará un mal presentador de antígeno (Russell, 1987).

En relación con esto hay que tener en cuenta, de un lado, que la expresión del antígeno de histocompatibilidad de clase II está regulada genéticamente (Kaye *et Blackwell*, 1989) y, de otro, que el parásito afecta a la expresión de dicho antígeno por parte del macrófago (Mitchel *et al*, 1987; Liew, 1989).

Es más, incluso cuando la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y II no está alterada, los macrófagos infectados con *L.infantum* pueden mostrar una reducción en la expresión de las moléculas de superficie CD18, CD11a y B7, necesarias para la activación celular T específica frente a *Leishmania*, lo que podría contribuir al deterioro de la respuesta inmunitaria protectora mediada por células T observada en los pacientes con una leishmaniosis visceral progresiva (Pinelli *et al*, 1996c).

Por otra parte, se ha visto que un mismo antígeno puede conferir protección o agravar la enfermedad dependiendo de la vía de administración, de donde se deduce la importancia de la forma de presentación del antígeno (Melby *et Sacks*, 1987; Mitchel *et al*, 1987; Liew, 1990a).

La prematura exposición a citoquinas de las células Th también parece ser crucial en la generación de uno u otro tipo de linfocitos T (Hsieh *et al*, 1992; Pearson *et Queiroz*, 1996; Kemp, 1997). La producción de IL-12 por parte de los macrófagos sería necesaria para la diferenciación de las células Th1 (Afonso *et al*, 1994; Tizard, 1996; Mattner *et al*, 1996). Los linfocitos Th2 se diferenciarían en presencia de IL-1 secretada por los macrófagos infectados con *L.major* (Bogdan *et al*, 1993; Chakkalath *et Titus*, 1994; Tizard, 1996) e IL-4 (Hsieh *et al*, 1992; Seder *et al*, 1992). Asimismo, se ha puesto en evidencia el papel de las células de Langerhans de la epidermis en la iniciación de la respuesta inmunitaria específica frente a la enfermedad (Moll, 1993).

Por otro lado, las citoquinas derivadas de las células T estimuladas pueden activar a su vez a los macrófagos, aumentando su capacidad destructora de microorganismos (Patterson *et Youmans*, 1970; Fowles *et al*, 1973; Murray *et al*, 1982; Frankenburg *et al*, 1993), mediante la generación de metabolitos reactivos de oxígeno (O₂, H₂O₂ y radicales OH⁻) (Hughes, 1988) y, sobre todo, de óxido nítrico (NO) (Liew *et al*, 1990b; Nacy *et Nelson*, 1991; Pinelli, 1996b).

Las células Th1 producen interferón gamma (IFN-gamma), potente activador de los macrófagos que aumenta su tamaño, movilidad y actividad metabólica y es considerado un factor crucial en la resistencia frente al protozoo, (Sadick *et al*, 1986; Pinelli *et al*, 1994b; Pinelli *et al*, 1995) e interleukina-2 (IL-2) que guía el proceso de división de los linfocitos Th que previamente hayan expresado en su superficie receptores para IL-2 e induce la producción de IFN-gamma (Charley *et Blecha*, 1991; Antczak *et Gorman*, 1992).

Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, con diversas acciones sobre la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B y mastocitos, (Varela, 1992; Chakkalath *et Titus*, 1994; Tizard, 1996) e IL-10, (Fiorentino *et al*, 1989) que inhibe la secreción de IFN-gamma y la producción de óxido nítrico (NO) (Cunha *et al*, 1992). Otras linfocinas como la IL-3, estimulante de la maduración de las células T inmaduras y de la diferenciación de células cebadas y basófilos; el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que provoca la proliferación y diferenciación de precursores medulares (Charley *et Blecha*, 1991; Tizard, 1996) así como la movilización de monocitos, la activación macrofágica y una mejoría de la granulocitopenia (Charley *et Blecha*, 1991; Murray *et al*, 1995); y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT-alfa), que actúa como una segunda señal y sinérgicamente con IFN-gamma para la producción de NO por el macrófago (Liew *et al*, 1990b; Nacy *et al*, 1991), son secretados en diferente cantidad por ambos tipos de células (Pinelli, 1996a; Tizard, 1996).

Funcionalmente, los linfocitos Th1 se caracterizan por mediar las reacciones de hipersensibilidad retardada mientras que las células Th2 carecen de esta capacidad (Cher *et Mosmann*, 1987).

Las células T CD8+ también jugarían un papel importante en la respuesta inmunitaria. En perros se ha visto que esta línea celular, no sólo es capaz de secretar IFN-gamma, sino que muestra actividad citolítica específica frente al parásito (Pinelli *et al*, 1994b; Pinelli *et al*, 1995).

Asimismo, diferentes estudios han puesto de manifiesto la capacidad fagocítica de neutrófilos, eosinófilos y monocitos sugiriendo la posibilidad de que estas células jueguen un papel en la defensa frente a la leishmaniosis (Chang *et al*, 1981; Pearson *et al*, 1987; Brandonisio *et al*, 1996). Además, neutrófilos y monocitos podrían ser vehículos para el transporte del parásito en la sangre (Hill, 1986).

Inmunidad humoral:

Al contrario que las células T, los **linfocitos B** reconocen el antígeno parasitario sin necesidad del antígeno de histocompatibilidad (Tizard, 1996). Así, una vez activados, en su mayoría se multiplican guiados por las interleuquinas 4, 5 y 6 (IL-4, IL-5 e IL-6) (Cox *et Liew*, 1992; Tizard, 1996), segregadas por los linfocitos Th2. Las células hijas se diferencian en dos grupos: células plasmáticas, que sintetizan inmunoglobulinas, y células de memoria (idénticas a las células madre), que quedan como reserva (Varela, 1992; Tizard, 1996).

La respuesta humoral, a pesar de ser importante en el curso de la leishmaniosis (Pinelli *et al*, 1994a), no interviene apenas en los mecanismos de resistencia del hospedador, por lo que no hay relación entre tal respuesta y el desarrollo de protección frente a la infección (Bourdeau, 1988; Slappendel *et Greene*, 1990).

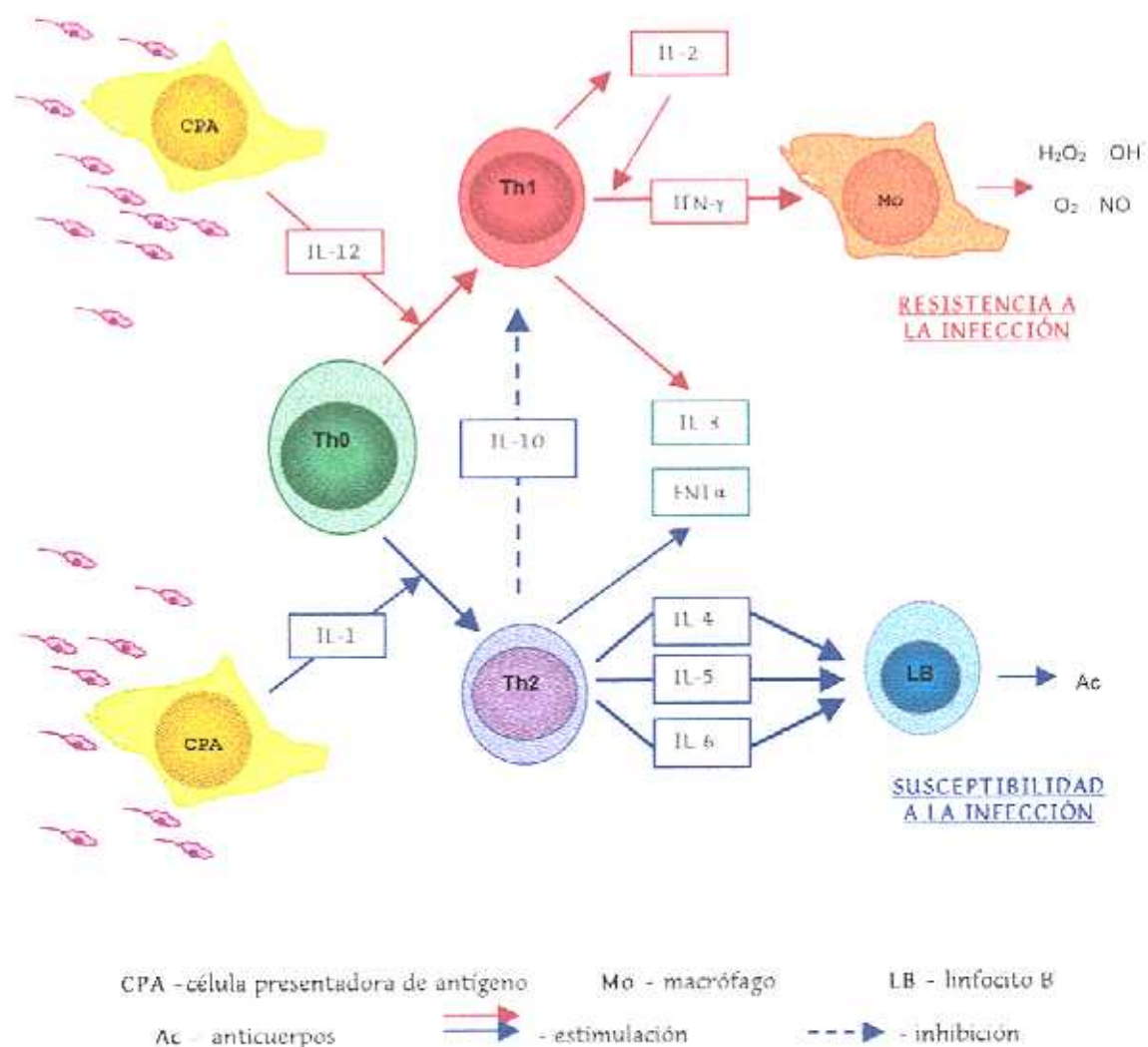
La proliferación policlonal de linfocitos B da lugar a la producción de gran cantidad de anticuerpos específicos e inespecíficos (e incluso, probablemente, a la síntesis de autoanticuerpos). Una consecuencia del elevado número de antígenos y anticuerpos circulantes es la formación de inmunocomplejos capaces de provocar diversos efectos nocivos en el animal, que incluyen alteraciones en órganos y tejidos como riñón, piel, articulaciones, etc. (Bourdeau, 1988; Varela, 1992; Dow *et Lappin*, 1995). Además, *in vitro*, se ha puesto en evidencia la capacidad de estos inmunocomplejos para inhibir la fagocitosis por parte de los monocitos y, por tanto, su papel en la modulación de la respuesta inmunitaria (Brandonisio *et al*, 1989).

Aunque los mecanismos inmunitarios mediados por células parecen ser más efectivos en controlar y limitar el curso de la infección (Pearson *et al*, 1983), varios estudios indican que las células B y los anticuerpos pueden influir tanto en la progresión de la enfermedad como en su curación (Pinelli, 1996a). Esta aparente contradicción puede explicarse por el hecho de que tanto los linfocitos Th1 como los Th2 pueden intervenir en la producción de anticuerpos, aunque difieren en su capacidad de estimular ciertos isotipos. Los linfocitos Th1 sustancialmente inducen más IgG2a mientras que los Th2 favorecen la producción de IgG1 e IgE (Coffman *et al*, 1988; Stevens *et al*, 1988).

Efectivamente, Deplazes y col (1995) tras analizar la especificidad de dos subclases de IgG en la respuesta humoral de perros infectados naturalmente con *L. infantum*, concluyen que los anticuerpos IgG1 se asocian con la susceptibilidad mientras que los IgG2 lo hacen con la resistencia a la enfermedad (Deplazes *et al*, 1995).

En cualquier caso, básicamente las leishmanias conseguirían el **mantenimiento y expansión de la infección** a través de la alteración de la inmunidad mediada por células (Carvalho *et al*, 1981; Liew, 1989). El fracaso de la inmunidad celular y, en consecuencia, de la eliminación de la infección, resultaría, fundamentalmente, de una alteración en el equilibrio entre los linfocitos Th1 (protectores) y los Th2 (supresores) (Leclere, 1989; Liew, 1990a).

Aunque la inmunopatología de esta enfermedad es extremadamente compleja e integra una gran variedad de poblaciones celulares y de citoquinas, el esquema siguiente recoge a modo de resumen una parte importante de los fenómenos inmunológicos desencadenados durante la infección por *Leishmania spp* y pone de manifiesto cómo el estímulo de los linfocitos Th1 se asociaría con la resistencia a la enfermedad y la estimulación de las células Th2 se relacionaría con la susceptibilidad a padecerla (esquema realizado a partir de las publicaciones de Cox *et al*, 1992; Bogdan *et al*, 1993):



Leishmania es, por tanto, capaz de vencer el sistema defensivo y diseminarse por todo el organismo con preferencia por los órganos hematopoyéticos y, en particular, por la médula ósea donde sigue multiplicándose. Después, migra desde estos puntos de multiplicación a otros órganos como piel, hígado, páncreas, riñones, glándulas adrenales, tracto digestivo, ojos, testículos, huesos, articulaciones, etc. (Ferrer, 1992; Spreng, 1993). Los parásitos se han encontrado prácticamente en todos los órganos (Lanotte *et al*, 1979) incluido el sistema nervioso central (Nieto *et al*, 1996).

Esta diseminación dura semanas o meses y continúa hacia fases avanzadas a no ser que se instaure un tratamiento. El protozoo causa serias lesiones mediante dos mecanismos: la producción de lesiones inflamatorias no supurativas y, como ya se ha comentado, la formación de inmunocomplejos circulantes que se depositan en los glomérulos renales, vasos sanguíneos y articulaciones (Ferrer, 1992).

En el perro la leishmaniosis parece desarrollarse siguiendo principalmente el modelo anérgico (Slappendel, 1988), con una falta de respuesta celular T unida a una gran producción de anticuerpos específicos (IgG) frente a *Leishmania* (Martínez *et al*, 1993). Este modelo de respuesta anérgica se manifestaría muy rápidamente tras el contacto parásito-hospedador observándose también en otras fases de la enfermedad (Abranches *et al*, 1991b; Bin hazim *et al*, 1993; Martínez *et al*, 1995).

Lo cierto, sin embargo, es que desde hace mucho tiempo se describen casos de perros con infección natural que desarrollan formas benignas con posterior desaparición espontánea de los signos clínicos y formas latentes asintomáticas que pueden activarse ante el padecimiento de otros procesos (Sánchez Botija, 1936; Lanotte *et al*, 1979). Tendríamos, por tanto, **dos clases de individuos en relación con la evolución clínica**: unos **resistentes**, entre los que se darían las formas latentes y benignas de la enfermedad y otros más **sensibles**, que reaccionarían más acusadamente a la infección (Sánchez Botija, 1936; Dunan, 1978). De hecho, estudios recientes han podido demostrar cómo la resistencia a la infección, en la leishmaniosis canina (*L. infantum*), está asociada a la inmunidad mediada por células (con altos niveles de IFN-gamma e IL-2) y a una reacción positiva de hipersensibilidad de tipo retardado, tanto *in vitro* (proliferación linfocitaria) como *in vivo* (reacción cutánea a la leishmanina), mientras que la susceptibilidad a adquirir la enfermedad se relaciona con la producción de anticuerpos (Cabral *et al*, 1992; Pinelli *et al*, 1994a; Cardoso *et al*, 1997), paralelamente a lo que ocurre en el hombre (Carvalho *et al*, 1981).

Por otro lado, la persistencia de parásitos virulentos en pacientes curados es una faceta aceptada de las infecciones por *Leishmania spp*. En el modelo ratón se han documentado evidencias de una reactivación de la leishmaniosis si el sistema inmunitario del hospedador fracasa en el control de los parásitos persistentes (Aebischer *et al*, 1997).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, presumiblemente la inmunosupresión puede conducir a una leishmaniosis visceral, tanto facilitando la adquisición del proceso como permitiendo la reactivación de una infección latente y podría explicar la alta incidencia de leishmaniosis visceral en individuos VIH positivos (Martínez *et al*, 1986; Berenguer *et al*, 1989; Tremblay *et al*, 1996) y en sujetos inmunocomprometidos no infectados con VIH (Quilici *et al*, 1988; Alvar *et al*, 1992).

Esto, unido a estudios que revelan una alta prevalencia de reacción cutánea positiva en personas aparentemente sanas (Marty *et al*, 1992; White *et al*, 1992), sugiere que una considerable proporción de la población "normal" podría estar infectada (portadores asintomáticos) en áreas endémicas. La prevalencia de infección asintomática latente con *L.infantum* podría tener importantes implicaciones para los bancos de sangre, terapias inmunosupresoras y programas de transplantes (Alvar *et al*, 1992).

En conclusión, el desarrollo de la leishmaniosis clínica depende de factores del parásito y del hospedador. El reto está en determinar el grado en que la forma clínica de la leishmaniosis es una expresión de la constitución genética del parásito (*virulencia*) o de la susceptibilidad innata y de respuesta del hospedador (*inmunidad*) (Pearson *et al*, 1983).

CUADRO CLINICO

La leishmaniosis se diagnostica en perros de todas las razas, tanto en machos como en hembras (Abranches *et al*, 1991a; Ferrer, 1992), con predominio de los machos en algunos estudios (Tesouro, 1984a; Slappendel, 1988; Denerolle, 1996). Este predominio se ha observado también en medicina humana (Cambroner *et al*, 1983; Federico *et al*, 1997) y se ha relacionado con una diferente exposición al vector y con diferencias genéticas, inmunológicas y hormonales entre los dos sexos (Brabin *et Brabin*, 1992). La mayor incidencia, descrita por algunos clínicos, en perros de guarda o de caza y en razas grandes (que viven en el exterior (Tesouro, 1984a; Acedo *et al*, 1996)) se explicaría por su mayor exposición al vector (Abranches *et al*, 1991a; Ferrer, 1992; Denerolle, 1996). Aunque la enfermedad se diagnostica tanto en jóvenes como en animales adultos y viejos (Slappendel, 1988; Denerolle, 1996), es raro encontrarla en perros de menos de 6 meses debido al largo periodo de incubación de este proceso (Abranches *et al*, 1991a; Ferrer, 1997a).

El tiempo previo a la aparición de los primeros síntomas, en la leishmaniosis canina, oscila entre tres meses y varios años (Dunan, 1978; Rodríguez *et al*, 1984; Franc, 1993; Ferrer, 1997a), llegándose a describir **periodos de incubación** de más de 6 años (Slappendel *et al*, 1988; Nash, 1993).

El primer signo, que a menudo pasa desapercibido, es una lesión que aparece en el punto de inoculación 20 días después de la infección experimental y que recibe el nombre de **chancro de inoculación**. Este chancro aumenta rápidamente de tamaño, hasta unos 2 cm, y después se ulcera (Franc, 1993), siendo una lesión semejante al Botón de Oriente en la leishmaniosis humana (Sierra, 1981; Cairó *et Muntané*, 1997).

En la infección natural puede presentarse una lesión cutánea única o múltiple, pero siempre en pequeño número y en disposición asimétrica situándose, por lo general, en la región de la cabeza, predominantemente en la trufa, morro o cara interna de los pabellones auriculares. Aparece alrededor de tres meses después de finalizar el periodo de actividad de los flebotomos.

La evolución del chancro sucede en un periodo de unos seis meses pasando por diferentes estadios. Comienza con una lesión eritemo-escamosa de 10 a 15 mm de diámetro rodeada de un anillo edematoso, seguida de una lesión úlcero-costrosa de 2-3 cm y, finalmente, de una fase precicatricial que precede a la desaparición completa del chancro (Vidor *et al*, 1991; Cairó, 1995; Cairó *et Muntané*, 1997). Este chancro es frecuente pero inconstante, transitorio y equívoco (Bourdoiseau, 1993).

Vidor y col. (1991) han observado que, con excepción de unos pocos casos, la mayor parte de los animales que desarrollan chancro de inoculación terminan por visceralizar la enfermedad (presencia de parásitos en médula ósea y seroconversión). Por otro lado, un pequeño porcentaje de los perros en los que no puede evidenciarse una lesión de primoinfección desarrollan seroconversión (Vidor *et al*, 1991). Estas diferencias podrían explicarse por el distinto *status* inmunitario de cada animal (Killick-Kendrick *et al*, 1994).

Debido a que *Leishmania* tiene una diseminación linfohematógena y es potencialmente capaz de llegar a todos los órganos y tejidos (Bourdoiseau, 1993), la sintomatología que podemos encontrar en el curso de esta enfermedad es variadísima (Slappendel, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992; García-Verdugo, 1996; Ferrer, 1997a). Las manifestaciones clínicas evolucionan lenta pero progresivamente con una respuesta muy discreta o nula a los antibióticos y corticoides (Ferrer, 1992), pudiendo establecerse una patocronia común para la leishmaniosis canina generalizada aunque indudablemente esté sujeta, en cada caso, a las características intrínsecas del hospedador y a algunos factores extrínsecos (terapias inespecíficas, enfermedades concurrentes, etc), admitiéndose varias posibilidades clínicas en cada fase evolutiva, pero otorgando a éstas una sucesión en el tiempo (Tesouro, 1984a).

Probablemente el signo más constante es una **linfadenopatía** (Lanotte *et al*, 1979; Tesouro, 1984a; Abranches *et al*, 1991a; Abranches *et al*, 1991b; Martínez *et Lloret*, 1992; Varela, 1992; Bourdoiseau, 1993; García-Verdugo, 1996) local o generalizada, caracterizada por un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos, (Swenson *et al*, 1988; Ferrer, 1992; Nash, 1993) que suele aparecer precozmente (Rodríguez *et al*, 1984; Franc, 1993) y llega a afectar al 90% de los animales diagnosticados (Slappendel, 1988). Histológicamente se revela como una hiperplasia reactiva con presencia de linfocitos, linfoblastos, células plasmáticas y macrófagos parasitados (Ferrer, 1992). La esplenomegalia también puede estar presente (Slappendel, 1988; Varela, 1992; Bourdoiseau, 1993; Franc, 1993) pero, al contrario que en el hombre (Quiles *et al*, 1979; Cambroner *et al*, 1983), es poco frecuente (Kontos *et Koutinas*, 1993). El estudio microscópico del bazo puede mostrar congestión, hematopoyesis extramedular, hemosiderofagocitosis, eritrofagocitosis y células plasmáticas, así como la presencia de leishmanias en el interior de los macrófagos (Swenson *et al*, 1988).

Asimismo, es muy característico que en el curso de la enfermedad aparezcan **alteraciones dermatológicas** (Sánchez Botija, 1936; Tesouro, 1984a) de carácter crónico, no pruriginosas y, a menudo, simétricas (Ferrer, 1992). Las lesiones cutáneas, caracterizadas por alopecia o hipotricosis, seborrea seca e hiperqueratosis (Tesouro, 1984a), pueden aparecer por todo el cuerpo pero suelen hacerlo antes (Sánchez Botija, 1936) y de forma más prominente alrededor de los ojos, zona dorsal de la nariz, pabellones auriculares (Slappendel, 1988; Bourdoiseau, 1993) y relieves óseos (Franc, 1993; Bourdoiseau, 1993).

También puede desarrollarse ulceración crónica (Tesouro, 1984a; Slappendel, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992) localizada particularmente en la cabeza y extremidades (Ferrer, 1992). Menos frecuentemente los perros enfermos presentan piodermas profundos localizados o generalizados (Martínez *et Lloret*, 1992), dermatosis pustular estéril o nódulos cutáneos (Tesouro, 1984a; Ferrer, 1992), que pueden aparecer de forma aislada y alcanzar varios centímetros de diámetro (Ferrer *et al*, 1990); estos nódulos, a veces ulcerados, pueden localizarse en distintas zonas de la piel (Slappendel, 1988). Además, pueden aumentar rápidamente (en varios días) de volumen simultáneamente a una hipertermia y después regresar (Bourdoiseau, 1993).

En resumen, las distintas manifestaciones cutáneas se agruparían, comúnmente, en cuatro grandes cuadros: alopecico-descamativo, dermatosis ulcerativa, forma nodular y dermatitis pustular. Histológicamente, en las formas cutáneas alopecico-descamativas y ulcerativas los hallazgos típicos son los de una dermatitis difusa con infiltrado inflamatorio compuesto de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos y eosinófilos. Los nódulos se corresponden con una acumulación focal de macrófagos, células gigantes multinucleadas y algunos linfocitos y células plasmáticas. El número de parásitos difiere a menudo según los casos pero, en general, es importante en la forma nodular, variable en la descamativa y bajo en la ulcerativa. En la forma pustulosa, aparecen pústulas subcorneales neutrofilicas sin acantolisis, una ligera dermatitis no supurativa, especialmente debajo de las pústulas, y pueden encontrarse un pequeño número de leishmanias en los macrófagos de la dermis (Ferrer *et al*, 1988).

Más raramente, las lesiones consisten en úlceras o fistulas crónicas asociadas a traumatismos locales (mordiscos, corte de orejas) que no responden a la terapia convencional o recidivan y que constituyen el único signo clínico de la enfermedad (Sánchez Botija, 1936; Prats *et Ferrer*, 1995). Este cuadro clínico podría corresponder a una forma latente de leishmaniosis en la que existiría afección de órganos hematopoyéticos. De esta manera, secundariamente a un traumatismo externo se desarrollarían lesiones inflamatorias metastáticas en los lugares afectados. Este mecanismo también podría explicar, en parte, la distribución de lesiones inflamatorias y ulcerativas en los puntos de presión que, frecuentemente, se observa en la leishmaniosis canina (Prats *et Ferrer*, 1995).

Asimismo, se han descrito casos con lesiones nodulares, granulomatosas y ulcerativas en mucosas (pene, lengua, cavidad oral, prepucio, etc), tanto en el perro (Font *et al*, 1996b; Lamothe, 1997b) como en el hombre (Dupond *et al*, 1984). Las lesiones en mucosas revelan la presencia de macrófagos (unos pocos cargados con leishmanias), células plasmáticas y linfocitos (Font *et al*, 1996b).

Un porcentaje de perros afectados, variable según los distintos autores, manifiestan perionixis con un crecimiento exagerado (Lanotte *et al*, 1979; Tesouro, 1984a; Rodríguez *et al*, 1984) y anormal de las uñas (Slappendel *et Greene*, 1990; Abranches *et al*, 1991a; Guy *et al*, 1993) acompañándose, en ocasiones, de edema e infiltración interdigital (Franc, 1993).

A menudo, los perros enfermos muestran **adelgazamiento** (Sánchez Botija, 1936; Tesouro, 1984a; Reiter *et al*, 1985; Swenson *et al*, 1988; Varela, 1992; Guy *et al*, 1993) que puede ir acompañado de una disminución (Ferrer, 1992; Martínez *et Lloret*, 1992), aumento (Kontos *et Koutinas*, 1993) o mantenimiento del apetito (Slappendel, 1988). La pérdida de peso puede asociarse con atrofia muscular generalizada (Slappendel, 1988) especialmente marcada en los músculos faciales (Tesouro, 1984a; Rodríguez *et al*, 1984; Ferrer, 1992; Kontos *et Koutinas*, 1993; Bourdoiseau, 1993; Franc, 1993) y que se va acentuando hasta desembocar en un estado verdaderamente caquético (Rodríguez *et al*, 1984; Slappendel, 1988; Bourdoiseau, 1993). Se ha sugerido que la caquexia podría ser debida a la competición parásito-hospedador por algunos nutrientes esenciales (Keenan *et al*, 1984).

La **disminución de la actividad física**, presente en un buen número de casos, puede estar asociada a fatiga, abatimiento (Tesouro, 1984a; Rodríguez *et al*, 1984; Bourdoiseau, 1993), alteraciones locomotoras secundarias a atrofia muscular (Kontos *et Koutinas*, 1993), neuralgia, poliartritis (Spreng, 1993) (a veces con una hinchazón visible de las articulaciones (Ferrer, 1992)), polimiositis, lesiones en las almohadillas, úlceras interdigitales (Slappendel, 1988) o, incluso, a procesos osteolíticos y periostitis proliferativa (Slappendel, 1988; Buracco *et al*, 1997; Lamothe, 1997b)

La **temperatura** corporal suele ser normal (Sánchez Botija, 1936; Slappendel, 1990). La hipertermia, si aparece, es transitoria (Rodríguez *et al*, 1984) (de unos días a varias semanas) y moderada (Slappendel, 1988; Bourdoiseau, 1993; Franc, 1993). Según algunos autores, sería consecuencia, principalmente, de enfermedades concomitantes (Sánchez Botija, 1936) como ehrlichiosis, babesiosis, lupus eritematoso sistémico e infecciones bacterianas (Kontos *et Koutinas*, 1993).

La causa de los episodios de epistaxis que aparecen en algunos animales (Millin *et al*, 1975; Swenson *et al*, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992; Franc, 1993; Nash, 1993) parece resultar de lesiones inflamatorias y ulcerativas de la mucosa, así como de un defecto en la funcionalidad (secreción) plaquetaria (Jüttner, 1996) ya que la trombocitopenia no suele ser lo suficientemente marcada como para explicar las **hemorragias** (Cabassu *et al*, 1988b; Ferrer, 1992). De todos modos, no puede descartarse la presencia de una vasculitis, probablemente inmunomediada, que contribuya a los trastornos hemorrágicos (Slappendel, 1990; Pumarola *et al*, 1991; Varela, 1992).

Las **alteraciones digestivas** son poco frecuentes (Tesouro, 1984a) y se describen como colitis crónicas erosivas o ulcerativas (Ferrer *et al*, 1991; Bourdoiseau, 1993) e inflamación granulomatosa de la pared intestinal que afecta principalmente a la mucosa y puede extenderse a la submucosa. El infiltrado inflamatorio está integrado por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos y células gigantes multinucleadas parasitadas (Ferrer, 1992; García, 1996). Kontos y Koutinas (1993) sin embargo, relacionan estas alteraciones digestivas, fundamentalmente, con afección renal o hepática (Kontos *et Koutinas*, 1993). La patogenia del sangrado gastrointestinal observado por algunos autores (Millin *et al*, 1975; Sanchis *et al*, 1976; Cabassu *et al*, 1988a; Slappendel, 1988; Franc, 1993; Bourdoiseau, 1993), sería comparable a la descrita para la epistaxis (Varela, 1992).

Aunque las referencias al respecto son muy escasas, Rollán (1994), en un amplio estudio anatomopatológico sobre la afección pancreática en perros con leishmaniosis, destaca la existencia de lesiones inflamatorias y degenerativas de localización y extensión variable en el páncreas de un buen número de casos (Rollán, 1994).

La **función hepática** pocas veces está alterada (Cabassu *et al*, 1988b; Gascón, 1994). El fallo hepático aparece como resultado de una hepatitis crónica por la presencia de parásitos en el hígado. Los animales afectados pueden presentar vómitos, inapetencia y pérdida de peso (Ferrer, 1992). Al contrario que en el hombre, en el que con frecuencia aparece un discreto aumento del tamaño del hígado (Quiles *et al*, 1979; Cambronero *et al*, 1983), la hepatomegalia en los perros enfermos es rara (Kontos *et Koutinas*, 1993) y consecuencia de un aumento en el número de células (histiocitos, macrófagos que pueden estar parasitados, eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas) (Slappendel, 1990). El hígado puede mostrar una degeneración hidrópica multifocal y confluyente de hepatocitos y depósito de hemosiderina en los sinusoides hepáticos y en los espacios porta (Swenson *et al*, 1988). Asimismo, se ha descrito la presencia de microgranulomas. En algunos casos, se aprecia un proceso inflamatorio diseminado que se asemeja a una hepatitis intersticial (García-Verdugo, 1996).

Los **signos oftalmológicos** son relativamente frecuentes, a veces precoces en su aparición y generalmente bilaterales (Swenson *et al*, 1988; Ayats, 1996) aunque, ocasionalmente, podemos encontrar lesión ocular unilateral en ausencia de cualquier otro síntoma sugerente de leishmaniosis (Swenson *et al*, 1988; Laugier *et Verro-Boulangier*, 1992). Las alteraciones oculares que pueden aparecer son muy variadas (Roze, 1996) y están ligadas al parásito o a los fenómenos inmunológicos que éste provoca (Laugier *et Verro-Boulangier*, 1992).

A menudo se describe la presencia de blefaritis, descamativa o granulomatosa (Roze, 1996) y normalmente asociada a la dermatitis facial, o de queratoconjuntivitis bilateral (Ferrer, 1997a). La conjuntivitis suele acompañarse de una hiperemia intensa de la mucosa conjuntival y se caracteriza por una quemosis importante. Otras veces se presenta como una inflamación nodular con pequeños nódulos de 0.8 a 6.5 mm - llamados leishmaniomas (Bourdoiseau, 1993) - localizados en el tercer párpado, borde libre de los párpados y limbo esclerocorneal, que suelen regresar espontáneamente en 4-6 días. Esta constituye una forma rara pero muy sugerente de la enfermedad (Roze, 1996).

Otros signos oculares evocadores de leishmaniosis incluyen el edema corneal y la uveítis anterior (Roze *et Pages*, 1994). La uveítis puede ser granulomatosa, con formación de nódulos que confluyen y contienen numerosos amastigotes. Mucho más frecuente es, sin embargo, la iritis no granulomatosa de tipo linfoplasmocitario con el iris edematoso, en miosis y, a veces, con formación de sinequias precoces, en la que no pueden detectarse parásitos (Roze, 1986; Ferrer, 1997a) y cuyo origen es, probablemente, inmunomediado (Ferrer, 1997a). De todos modos, la uveítis da lugar a un cuadro bastante complejo y es posible que una uveítis primaria (por acción directa del parásito) y una secundaria (por efecto de inmunocomplejos) se sucedan (Roze, 1986).

Aunque el humor vítreo se encuentra frecuentemente afectado y se han detectado coriorretinitis y hemorragias retinianas, parece que las patologías del segmento posterior, de la papila y del nervio óptico no presentan la gravedad del segmento anterior.

Las complicaciones de la leishmaniosis ocular serían: queratoconjuntivitis seca, sobreinfecciones, hiperpigmentación corneal, glaucoma, atrofia de iris y cataratas (Roze, 1986).

Las alteraciones del **aparato reproductor** que pueden aparecer en el curso de la leishmaniosis incluyen orquitis y epididimitis (Martínez *et Lloret*, 1992), atrofia testicular, infiltrado inflamatorio con abundantes linfocitos, células plasmáticas y macrófagos que evoluciona hacia una fibrosis intersticial, atrofia de conductos epididimarios, azoospermia, etc (Pizarro, 1986). Aunque se ha señalado que en las hembras que padecen un cuadro clínico poco importante o son asintomáticas la gestación produce un aumento en el número e intensidad de los síntomas y lesiones y propicia el desarrollo de anemia e insuficiencia renal (Cairó *et Font*, 1991), algunos autores sólo observan aborto y momificación de cachorros pero no una reanudación del proceso (Varela, 1992). Por otro lado, en el kala-azar se ha observado que la infección durante el embarazo no conduce necesariamente a un cuadro severo en la madre (Brabin *et Brabin*, 1992; Meinecke *et al*, 1997).

Raramente encontramos síntomas respiratorios (Slappendel, 1988). De hecho, se ha descrito la presencia de un escaso número de parásitos en el interior de macrófagos alveolares, sin que se detecte reacción frente a los microorganismos (Swenson *et al*, 1988). Igualmente, son muy pocas las referencias sobre alteraciones cardíacas (pericarditis) (Font *et al*, 1993a; Bourdoiseau, 1993; Lamothe, 1997b) y signos nerviosos (Lanotte *et al*, 1979; Rodríguez *et al*, 1984; Tesouro, 1984a; Franc, 1993).

De forma excepcional se ha documentado el desarrollo de una vasculitis sistémica correspondiente a una arteriolitis necrotizante, probablemente inmunomediada, por depósitos de inmunocomplejos en los vasos (Pumarola *et al*, 1991).

En fases avanzadas de la enfermedad suelen evidenciarse **trastornos renales** (Rodríguez *et al*, 1984; Tesouro, 1984a) que pueden acompañarse de poliuria/polidipsia, depresión, vómitos y deshidratación (Koutinas *et al*, 1995). Las alteraciones renales incluyen nefritis intersticial, tubulonefrosis (García-Verdugo, 1996) y glomerulonefritis que puede ser membranosa (Millin *et al*, 1975; García-Verdugo, 1996), membranoproliferativa (Pospischil *et al*, 1987) o mesangioproliferativa, pero lo más frecuente es que sea una mezcla de las tres con predominio de alguna de ellas. En cualquier caso, suele corresponderse de manera casi constante con una glomerulonefritis inmunomediada (Bergeaud, 1988) por depósito de inmunocomplejos circulantes (Naskidachvili *et Peroux*, 1988; López *et al*, 1996) (que se forman en la sangre y no *in situ*, pues se depositan en localización subendotelial o mesangial pero no subepitelial, lo que explica que en muchos casos no se detecten parásitos en el parénquima renal (Koutinas *et al*, 1995).

El método de precipitación por polietilenglicol ha permitido, en un estudio, caracterizar un antígeno de *L.infantum* de 51 kD (incluido en los inmunocomplejos circulantes) presente en todos los perros con leishmaniosis complicada con nefritis. Habría, sin embargo, que determinar si esta proteína de 51 kD es directamente responsable de tal complicación (Mary *et al*, 1993).

La glomerulonefritis progresa a un fallo renal y es causa frecuente de la muerte del animal (Ferrer, 1992; Bourdoiseau, 1993; Franc, 1993). Más raramente se describe la aparición de un síndrome nefrótico asociado a la lesión glomerular (Font et al, 1993b). En ocasiones se presenta una insuficiencia renal aislada (Giauffret, 1976) de manera súbita e intensa con signos de fallo renal agudo típicos de una intoxicación (Lamothe, 1997b) y poco evocadores de la enfermedad (postración, anorexia y, a veces, vómitos), siendo muy rápida la alteración del estado general (en dos o tres días o, incluso, en 24 horas) (Naskidachvili et Peroux, 1988; Cabassu et al, 1988a).

BIOPATOLOGIA

La leishmaniosis canina se acompaña de alteraciones hematológicas y bioquímicas que son detectables a través del laboratorio.

Los resultados de los análisis de sangre y orina son muy variables (Ferrer, 1992). La **anemia** es frecuente tanto en perros (Cairó, 1991; Ferrer, 1992) como en el hombre (Quiles et al, 1979; Quilici et al, 1988). Suele ser moderada, no regenerativa (Cairó, 1991; Ferrer, 1992) (normocrómica y normocítica) (Keenan et al, 1984; Rodríguez et al, 1984; Binhazim et al, 1993) y se acentúa a medida que avanza la enfermedad (Rodríguez et al, 1984) y en función de la carga parasitaria en la médula ósea (Aceña et al, 1997).

El **recuento leucocitario** suele estar bajo (Groulade, 1977; Rodríguez et al, 1984; Binhazim et al, 1993) aunque, generalmente, dentro de los límites de normalidad (Varela, 1992). Algunos autores mantienen que la fórmula leucocitaria no se afecta de forma apreciable (Varela, 1992), mientras que otros señalan una inversión en la fórmula por un aumento de los linfocitos y una disminución de los neutrófilos (Groulade, 1977; Keenan et al, 1984; Binhazim, 1993), de forma parecida a lo que ocurre en medicina humana (Cabassu et al, 1988b; Quilici et al, 1988). Otros investigadores observan, frecuentemente, monocitosis (Bourdoiseau, 1993). La eosinofilia es inconstante (Martínez et Lloret, 1992)(Sanchis et al, 1976) y puede aparecer de forma fugaz en periodos de invasión parasitaria (Rodríguez et al, 1984).

En ocasiones puede haber una leucopenia acompañando a anemias graves o pancitopenias. Estas situaciones reflejan un agotamiento medular y se presentan de forma esporádica en leishmaniosis crónicas no tratadas y en infecciones mixtas con otros parásitos (ehrlichiosis, babesiosis) (Varela, 1992). En las formas cutáneas con evolución crónica las infecciones secundarias pueden provocar una leucocitosis con neutrofilia (Rodríguez et al, 1984). La trombocitopenia es inconstante (Rodríguez et al, 1984; Denerolle, 1996) y rara vez baja de 100 000 plaquetas/mm cúbico (Cabassu et al, 1988b; Varela, 1992). La velocidad de sedimentación aumenta (Keenan et al, 1984) como expresión de un incremento de las globulinas plasmáticas y de la anemia (Groulade, 1977; Rodríguez et al, 1981).

En la leishmaniosis canina el **título de anticuerpos**, por inmunofluorescencia indirecta (IFI), frente a la enfermedad se hace positivo (seroconversión) entre 1 y 5 meses después de la infección experimental (Vitu et al, 1973; Abranches et al, 1991b; Binhazim et al, 1993; Carrera et al, 1996) y va aumentando progresivamente.

Algo después comienzan las alteraciones del **proteinograma** (Vitu *et al*, 1973) que preceden, en varias semanas, a la aparición de los primeros signos clínicos (Vitu *et al*, 1973; Groulade, 1983). Estas alteraciones se van haciendo cada vez más evidentes (Vitu *et al*, 1973; Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1983; Binhazim *et al*, 1993; Denerolle, 1996) y no sólo tienen valor en la orientación del diagnóstico sino que también resultan útiles para darnos una idea de la antigüedad del proceso (Groulade, 1988; Denerolle, 1996).

En las fases de estado de la enfermedad, las **proteínas séricas** totales están elevadas debido a un aumento policlonal de las β (Groulade, 1983; Rodríguez *et al*, 1984; Keenan *et al*, 1984; Denerolle, 1996) y, sobre todo, de las γ -globulinas (Guercio *et Iannizzotto*, 1978; Groulade, 1983; Keenan *et al*, 1984; Tesouro, 1984a; Rodríguez *et al*, 1988; Slappendel, 1988; Swenson *et al*, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992; Bourdoiseau, 1993; Denerolle, 1996) que, a veces, forman un bloque β - γ (Vitu *et al*, 1973; Groulade, 1988). El aumento de las β y γ -globulinas suele acompañarse de una hipalbuminemia (Guercio *et Iannizzotto*, 1978; Groulade, 1983; Keenan *et al*, 1984; Tesouro, 1984a; Rodríguez *et al*, 1988; Slappendel, 1988; Swenson *et al*, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992; Bourdoiseau, 1993; Denerolle, 1996) debida a una pérdida de proteínas secundaria a enteropatía, nefropatía, hepatopatía o malnutrición (Kontos *et Koutinas*, 1993; Tesouro *et al*, 1994b). Esto determina, tanto en la leishmaniosis humana (Quiles *et al*, 1979; Quilici *et al*, 1988) como en la canina, la inversión del cociente albúmina/globulinas (Alb/Glo) que a veces desciende incluso por debajo de 0.2 (Vitu *et al*, 1973; Rodríguez *et al*, 1984).

La mayoría de las globulinas presentes en exceso en la fase de estado se corresponden esencialmente con inmunoglobulinas G (IgG) (Vitu *et al*, 1973), pero también se detectan otras como IgM (Vitu *et al*, 1973; Slappendel, 1988) e IgA (Slappendel, 1988). Una gran parte de ellas no son anticuerpos parásitoespecíficos sino anticuerpos inespecíficos (consecuencia de la activación policlonal de los linfocitos B por mitógenos parasitarios) (Cabassu *et al*, 1988b; Quilici *et al*, 1988), algunas citoquinas (Barral-Netto *et al*, 1991), complejos antígeno-anticuerpo (Vitu *et al*, 1973; Slappendel, 1988), auto-anticuerpos e inmunoglobulinas atípicas (Vitu *et al*, 1973). Como ya se ha comentado en el capítulo de inmunopatología, estos anticuerpos no son protectores, por lo que no confieren resistencia frente a la enfermedad (Slappendel *et Greene*, 1990; Bourdeau, 1998).

A pesar de que algunos estudios realizados en perros experimentalmente infectados con *L.infantum* muestran que las tasas de anticuerpos específicos concuerdan con la concentración de las proteínas séricas (Carrera *et al*, 1996) y, en la práctica clínica, parece que una tasa elevada de proteínas (en particular de γ -globulinas) se asocia con un título elevado de anticuerpos, esto no ocurre siempre (Roze, 1990). De hecho, otros autores no observan correlación entre tales títulos, obtenidos por IFI y/o ELISA, y la magnitud de la hiperyglobulinemia (Vitu *et al*, 1973; Ferrer, 1992).

Por otro lado, Giauffret y col. (1976) han puesto de manifiesto cómo en las leishmaniosis viscerales graves las tasas de anticuerpos (por IFI) son, generalmente, más elevadas que en las formas cutáneas de evolución lenta. Sin embargo, tampoco se ha podido establecer un paralelismo entre el título de anticuerpos específicos frente al parásito, la afección clínica (Dunan, 1978; Lanotte *et al*, 1979; Abranches *et al*, 1991a) y la riqueza parasitaria (Reiter *et al*, 1985; Roze *et Pages*, 1994; Denerolle, 1996).

En algunos casos se citan elevaciones de β o γ -globulinas con aspecto monoclonal en el proteinograma (Vitu *et al*, 1973; Groulade, 1988; Font, 1996a; Beaufile *et al*, 1996), lo que también ocurre en la infección por *E. canis* en el perro (Tesouro *et al*, 1994b; Sainz, 1996) y que, probablemente, sean elevaciones policlonales de banda estrecha (Varela, 1992) cuyo significado se desconoce. En el hombre están a veces asociadas a ciertos síndromes de inmunodeficiencia, en los cuales sólo unos pocos clones de linfocitos serían capaces de responder a los antígenos (Dorfman *et Dimski*, 1992). Por otro lado, hay que tener en cuenta que las gammapatías monoclonales aparecen, asimismo, en mieloma múltiple, macroglobulinemia o tumores linfoproliferativos (Dorfman *et Dimski*, 1992; Tesouro *et al*, 1994).

La presencia de un pico en las α -2 globulinas no sólo es característico de una afección renal, sino que aparece también en fases de diseminación parasitaria (Groulade, 1977; Rodríguez *et al*, 1984; Tesouro, 1984a) y marca la existencia de lesiones orgánicas que están en fase evolutiva (Groulade, 1983). Cuando este pico sobrepasa los 2/3 de la altura del trazo de la albúmina, la existencia de un foco de necrosis es casi segura (Groulade, 1988).

El proteinograma debe hacerse completo y no sólo determinar las proteínas séricas totales ya que, particularmente en fases avanzadas de la enfermedad con afección renal, una disminución severa de la albúmina por eliminación urinaria de proteínas, puede compensar el aumento de γ -globulinas y conducir al restablecimiento de los valores normales (o incluso inferiores) de las proteínas séricas totales (Rodríguez *et al*, 1984; Martínez *et Lloret*, 1992). En la afección hepática, además de la hipoalbuminemia, se produce un aumento de la alanin amino transferasa (ALT) y de la aspartato amino transferasa (AST) (Ferrer, 1992).

El urianálisis revela la frecuente presencia de proteinuria (Cabassu *et al*, 1988b), que va de ligera a intensa (Groulade, 1988; Kontos *et Koutinas*, 1993; Koutinas *et al*, 1995) y, a veces, de isostenuria o hipostenuria (Koutinas *et al*, 1995). En el sedimento urinario puede detectarse la presencia de cilindros hialinos y/o granulares (Groulade, 1988; Naskidachvili *et Peroux*, 1988; Koutinas *et al*, 1995) y, ocasionalmente, hematuria (Cabassu *et al*, 1988a).

La elevación de la urea y de la creatinina se interpreta como una insuficiencia renal (Slappendel, 1988; Ferrer, 1992) ocasionada por un fallo renal crónico y tiene muy mal pronóstico (Rodríguez *et al*, 1981). Parece que el aumento de la creatinina va siempre asociado a un aumento de la azotemia, pero no al revés. En los casos en los que el aumento de la azotemia no va acompañado de una proteinuria significativa ni de un incremento en los valores de creatinina por encima de los niveles normales, la evolución suele ser buena (Cabassu *et al*, 1988b).

En casos precoces sólo se detecta proteinuria y cilindruria (Groulade, 1988). En este sentido, la determinación del cociente proteína urinaria total/creatinina urinaria (que suele ser del orden de 6 en caso de glomerulonefritis (Naskidachvili *et Peroux*, 1988)) podría ser de gran utilidad en la detección precoz de una lesión renal en la leishmaniosis canina (Palacio *et al*, 1995). Asimismo, la determinación de la actividad de enzimas urinarias, particularmente de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y de γ -glutamyl transpeptidasa (GGT), resultaría de gran valor en la detección de lesión renal en la leishmaniosis canina (Palacio *et al*, 1997).

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la leishmaniosis canina se basa en una serie de presunciones y pruebas que se extraen de la historia clínica (anamnesis), la exploración y las pruebas laboratoriales inespecíficas y específicas:

Diagnóstico clínico (anamnesis y exploración):

Cualquier perro que viva o haya estado en una zona endémica debería considerarse como sospechoso, especialmente si se trata de un animal de exterior, de varios meses de edad o más y muestra uno o varios síntomas de los anteriormente expuestos (Franc, 1993; Bourdoiseau, 1993). Aunque sería imprudente eliminar por completo una sospecha de leishmaniosis en perros que vivan en zonas a priori libres de esta enfermedad o que no parezcan expuestos a la picadura del flebotomo, la **procedencia**, la **edad** y los **hábitos de vida** del animal, así como la respuesta a tratamientos recibidos anteriormente, deberían ser tenidos en cuenta a la hora de jerarquizar las hipótesis diagnósticas (Bourdoiseau, 1993). En áreas enzoóticas tendrían que realizarse análisis periódicos de leishmaniosis en todos los perros independientemente de la presencia de signos clínicos (Marty *et Le Fichoux*, 1988; Kontos *et Koutinas*, 1993).

La **sintomatología clínica** de la leishmaniosis canina en fase de estado suele ser clara y rara vez pasa desapercibida para cualquier clínico que ejerza su actividad en una zona endémica (Tesouro *et al*, 1995c). La aparición de los síntomas descritos anteriormente ligados a la anamnesis no suele dejar dudas para emitir el juicio diagnóstico (presuntivo). Sin embargo, junto a estas formas generales, completas y clásicas existen evoluciones atípicas en las que el cuadro clínico es poco uniforme y los síntomas menos evidentes (Rodríguez *et al*, 1984).

La extremada variabilidad en el curso de la enfermedad conduce a que ciertos perros puedan padecer la infección y ser portadores de parásitos durante meses sin revelar sintomatología clínica (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Abranches *et al*, 1991a). De hecho, todas las formas intermedias entre estos estados de infección latente y las formas graves con cuadro clínico completo son posibles (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984).

Pruebas laboratoriales inespecíficas (diagnóstico orientativo):

Incluyen una serie de pruebas que ponen de manifiesto las variaciones hematológicas y bioquímicas anteriormente descritas (Rodríguez *et al*, 1984) y ayudan a reforzar el diagnóstico presuntivo basado en la anamnesis y la exploración (Martínez *et Lloret*, 1992).

Todas estas pruebas no sólo tienen valor diagnóstico sino también pronóstico porque permiten valorar la funcionalidad de los distintos órganos (particularmente del hígado y del riñón) (Martínez *et Lloret*, 1992) y determinar el estado general del animal (Nuñez-Torrón *et al*, 1996).

El estudio de las proteínas séricas resulta muy interesante en la orientación del diagnóstico de la enfermedad. En este sentido, las primeras técnicas empleadas fueron los tests de formol-gelificación y de sero-floculación que presentan una gran simplicidad de ejecución y de lectura (Sanchez Botija, 1936; Gonzalez, 1955; Giauffret *et al*, 1976; Dunan, 1978).

Sin embargo, la **electroforesis de las proteínas séricas (proteínograma)** resulta especialmente relevante ya que permite obtener una gráfica en la que aparecen separadas las distintas fracciones de globulinas (Giauffret *et al*, 1976) que, además, pueden ser cuantificadas (Groulade, 1983). Las alteraciones del proteinograma (elevación de las fracciones β y γ -globulinas) son particularmente indicativas de una sospecha de leishmaniosis.

Para que los datos obtenidos sean válidos hace falta un suero no hemolizado y que el animal, en los últimos 10-15 días, no haya estado bajo la influencia de corticoides (Groulade, 1988; Cairó *et Font*, 1991) (ya que un tratamiento corticoide durante más de 5 días, suspendido menos de 10 días antes de la obtención de la muestra, entraña una reducción importante del valor de las β y γ -globulinas (Groulade, 1983)).

Aunque se pueden encontrar modificaciones en el aspecto del proteinograma en otras muchas enfermedades (cirrosis, hepatitis crónica, tuberculosis, piómetra, enfermedades sistémicas, etc) no serían tan importantes como las que suelen presentarse en la leishmaniosis (Groulade, 1983).

En la leishmaniosis canina el proteinograma se revela como un elemento útil para la orientación del diagnóstico, para determinar el momento de evolución y sugerir la existencia de una eventual complicación y para el tratamiento, pues permite aplicar una terapia eficaz y controlada (Groulade, 1988).

Pruebas laboratoriales específicas:

El método definitivo de diagnóstico es la **identificación del parásito**, libre o en el interior de macrófagos (Slappendel *et Greene*, 1990), por punción de ganglio (Abranches *et al*, 1991a) o médula ósea (cresta iliaca, fémur o costilla) y tinción con May Grünwald-Giemsa, Diff-Quick (Ferrer, 1992; Kontos *et Koutinas*, 1993) o Wright (Slappendel *et Greene*, 1990).

La biopsia ganglionar es de muy fácil ejecución (Abranches *et al*, 1991a) pero los resultados no son constantes (Catarsini, 1978). Por ello, el material más idóneo para la búsqueda de leishmanias es la médula ósea (Denerolle, 1996) ya que la técnica comporta poco riesgo y resulta muy fácil identificar los amastigotes, tanto libres en el campo de visión como incluidas en el interior de macrófagos (Catarsini, 1978). El número de parásitos aspirados varía considerablemente de unos animales a otros (Kontos *et Koutinas*, 1993) y no se correlaciona con la severidad de los signos clínicos (Slappendel, 1988) pero, lógicamente, la detección de una sola célula parasitada es un hallazgo patognomónico (Ferrer, 1992).

El problema de estos métodos es que, en ocasiones, resulta imposible detectar los protozoos (Ferrer, 1992) y a menudo requiere una búsqueda paciente y reiterada de los mismos, examinando varias muestras de las que, a veces, sólo una es positiva (Dunan, 1978).

De hecho, no es raro encontrar falsos negativos especialmente en fases precoces de la enfermedad (Abranches et al, 1991a; Tesouro et al, 1992a) y en recidivas de casos crónicos (Slappendel, 1988). En fases avanzadas y en casos tratados también puede ser difícil evidenciar los microorganismos (Kontos et Koutina, 1993).

La detección del parásito en otros tejidos como piel (sana o ulcerada) (Abranches et al, 1991a), bazo (Sánchez Botija, 1936) o hígado (Franc, 1993) es posible pero difícil y resulta poco práctico (Tesouro et al, 1984b; Slappendel et Greene, 1990). El empleo de técnicas inmunocitoquímicas (inmunoperoxidasa), extremadamente sensibles, facilitan la identificación de los parásitos en las preparaciones tisulares (Ferrer et al, 1988a; García-Verdugo, 1996). Muy raramente se observan amastigotes en líquido sinovial de perros infectados (Spreng, 1993) o en sangre periférica (Tesouro et al, 1984b; Kontos et Koutinas, 1993).

Si no se consigue encontrar los protozoos el diagnóstico puede ser establecido por el cultivo de los mismos a partir de aspirados de ganglio, médula ósea u otros tejidos en medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) o medio Schneider's *Drosophila*. Asimismo, puede realizarse mediante inoculación en animales de laboratorio (Reiter et al, 1985; Slappendel et Greene, 1990; Buffet et al, 1996) o por xenodiagnóstico (Molina et al, 1994a; Molina et al, 1994b). La infección experimental de *P. perniciosus* se utiliza como xenodiagnóstico directo para valorar el poder infectivo de perros con leishmaniosis (Molina et al, 1994a) o como xenodiagnóstico indirecto, utilizando sangre de enfermos coinfectados con *L. infantum* y virus de la inmunodeficiencia humana (Molina et al, 1994b). Sin embargo, estos métodos se consideran poco prácticos y están restringidos a centros de investigación (Kontos et Koutina, 1993).

Para evitar estos problemas el serodiagnóstico parece una buena alternativa (Neogy et al, 1992). Así, se han ido desarrollando un gran número de pruebas que permiten la detección de anticuerpos específicos frente al parásito como son: fijación de complemento (González, 1955; Lanotte et al, 1974; Giauffret et al, 1976; Dunan, 1978), reacciones de aglutinación (directa (Neogy et al, 1992), hemoaglutinación indirecta (Giauffret et al, 1976), aglutinación-látex (Bray et Lainson, 1967)), reacciones de precipitación (inmunodifusión (Rassam et Al-Mudhaffar, 1980; Chiacchio, 1985), inmunoelectroforesis (Mansueto et al, 1979; Monjour et al, 1978)).

De entre todas las técnicas serológicas las más utilizadas actualmente son, sin duda, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Lanotte et al, 1974; Tesouro, 1984; Berenger, 1988; Slappendel, 1988; Cairó et Font, 1991; Franc, 1993; Roze y Pages, 1994; Tesouro et al, 1995c) y distintos tipos de enzimoimmunoensayo (ELISA) (Ho et al, 1983; Slappendel et Greene, 1990; Guy et al, 1993) (Dot-ELISA (Pappas et al, 1983; Ferrer et al, 1995; Mancianti et al, 1996; Fisa et al, 1997), ELISA indirecto (Martín et al, 1996), 70kD ELISA (Okong'o-Odera, 1993), micro-ELISA (Rassam et Al-Mudhaffar, 1980)).

Ambas técnicas muestran una gran correlación entre los niveles de anticuerpos obtenidos por cada una de ellas (Fisa et al, 1997) y tienen una alta sensibilidad y especificidad (Rodríguez et al, 1988; Mancianti et al, 1995; García-Verdugo, 1996). El umbral de positividad para la IFI suele establecerse alrededor de la dilución 1/100 (Quilici et al, 1968; Lanotte et al, 1974; Dunan, 1978; Tesouro, 1984a; Franc, 1993; Dye et al, 1993; Kontos et Koutinas, 1993; Laruelle-Magallon et Toga, 1996) pero es variable dependiendo del laboratorio (Laurelle-Magallon et Toga, 1996).

El método ELISA resulta particularmente interesante para poder analizar rápidamente una muestra muy numerosa (Jiménez, 1987; Laruelle-Magalon *et Toga*, 1996), como ocurre en los estudios de seroprevalencia (García, 1994). La ventaja de la IFI es que permite realizar el seguimiento del enfermo (Roze *et Pages*, 1994; Vercamen *et De Deken*, 1996; Millesimo *et al*, 1996).

Los resultados de la serología deben interpretarse en conjunto con el cuadro clínico (Ferrer, 1992) y laboratorial (Martínez *et Lloret*, 1992), ya que la experiencia clínica en países endémicos ha demostrado que algunos animales infectados permanecen seronegativos (Ferrer *et al*, 1995), sobre todo, cuando el umbral de positividad por IFI es $\geq 1/100$ (Dye *et al*, 1993). Por el contrario, algunos autores señalan que en casos seropositivos sin enfermedad clínica ni laboratorial nunca han encontrado parásitos en médula ósea y la mayoría de estos casos se han negativizado con el tiempo, aunque algunos han acabado por presentar signos clínicos y laboratoriales con punción medular positiva (Martínez *et Lloret*, 1992).

Un resultado positivo con el clásico cuadro sería suficiente para el diagnóstico, pero habría que ser precavidos en caso de un título positivo o dudoso con lesiones incompatibles con el diagnóstico (Ferrer, 1992; Kontos *et Koutinas*, 1993), puesto que las técnicas serológicas verifican la presencia de anticuerpos pero no prueban la enfermedad activa (Ferrer, 1997b). En cualquier caso, hay que tener en cuenta que los perros infectados rara vez eliminarían el parásito espontáneamente sin presentar signos clínicos de la enfermedad (Lanotte *et al*, 1979), por lo que un título positivo indicaría enfermedad actual (Slappendel, 1988).

Una serología negativa no descarta leishmaniosis cuando se realiza de forma rutinaria (Slappendel, 1988). En los casos por debajo del umbral de positividad hay que mantener la hipótesis, al menos en principio, de que el animal sufra otro proceso, de que tenga verdaderamente leishmaniosis pero esté en periodo de incubación y la tasa de anticuerpos específicos sea todavía muy débil (Bourdoiseau, 1993), de que la respuesta inmunitaria humoral del hospedador sea muy pobre (Dunan, 1978; Ferrer *et al*, 1995) o de que se hayan producido contactos parásito-hospedador sin que el parásito haya llegado a establecerse debido a una resistencia natural del hospedador (Fisa *et al*, 1997).

En estos casos dudosos es recomendable repetir la determinación 15-30 días después para evitar falsos negativos (Dunan, 1978; Euzeby, 1982; Ho *et al*, 1983; Haas *et al*, 1988; Ferrer *et al*, 1995). Si la reacción es positiva a una tasa de dilución sérica superior a dos diluciones con respecto a la primitiva (seroconversión), podemos considerar al animal como leishmaniósico (Euzeby, 1982).

Finalmente, hay que tener en cuenta que dependiendo de la sensibilidad y especificidad de la prueba usada puede haber un mayor o menor porcentaje de falsos positivos o negativos (Slappendel *et Greene*, 1990).

Los animales inmunodeprimidos sometidos a corticoterapia abusiva o antibioterapia, pueden dar falsos negativos, en especial con las técnicas serológicas (IFI y ELISA) (Dunan, 1978; Euzeby, 1982).

En individuos VIH positivos con leishmaniosis probada la ausencia de títulos sugestivos se ha relacionado con la profunda alteración del sistema inmunitario que acompaña al SIDA (Martínez *et al*, 1987).

El diagnóstico de leishmaniosis en estos casos debería basarse en cultivos de muestras en medios apropiados, ya que muchos de estos pacientes presentan títulos de anticuerpos insignificantes frente a *Leishmania* (Berenguer *et al*, 1989; Serra *et al*, 1997; Cañavate *et al*, 1997) e, incluso, ausencia de visualización de amastigotes en extensiones de médula ósea y, sin embargo, dan lugar a cultivos positivos (Berenguer *et al*, 1989). El xenodiagnóstico indirecto, como ya se ha mencionado, sería otra buena alternativa diagnóstica en este tipo de pacientes (Molina *et al*, 1994b).

Otros autores consideran el empleo de la leucoconcentración como una técnica fácil, rápida y barata para el diagnóstico de leishmaniosis a partir de sangre periférica. Los resultados obtenidos con esta técnica en pacientes VIH positivos serían muy superiores en comparación con otros métodos diagnósticos como el examen de cultivos de muestras sanguíneas y las extensiones de médula ósea (Izri *et al*, 1996).

Además, hay que tener presente la posibilidad de **reacciones cruzadas** con otros procesos. Así, en medicina humana la tuberculosis (Giauffret *et al*, 1976), el paludismo y la tripanosomiasis pueden dar lugar a falsos positivos (Quilici *et al*, 1988). En el perro se han descrito reacciones cruzadas entre diferentes especies de *Leishmania* (Slappendel, 1988), cosa que no ocurre ni con la piroplasmosis (Dunan, 1978) ni con la ehrlichiosis (datos no publicados (Servicio de Diagnóstico de ehrlichiosis canina).

Ensayos experimentales muestran la posibilidad de utilizar un PEG-ELISA (polietileno glicol enzyme-linked immunosorbent assay) para la detección de antígenos parasitarios específicos en inmunocomplejos circulantes (Azazy *et al*, 1994). Esto sería análogo al diagnóstico parasitológico directo y podría salvar algunos problemas como los falsos negativos obtenidos con los métodos serológicos habitualmente empleados (especialmente frecuentes en personas afectadas de SIDA (Martínez *et al*, 1987; Alvar *et al*, 1997)) o la posible persistencia de anticuerpos en individuos ya curados que darían lugar a falsos positivos (Azazy *et al*, 1994).

El inmunoblotting es una técnica serológica altamente sensible y específica (Mary *et al*, 1992; Cardenosa *et al*, 1995; García-Verdugo, 1996; Aisa, 1997) y de gran valor diagnóstico, capaz de detectar la infección más precozmente que la IFI (Carrera *et al*, 1996; Berrahal *et al*, 1996; García, 1994). Sin embargo, es muy laboriosa, hay que invertir mucho tiempo en realizarla y no es una prueba cuantitativa (Neogy *et al*, 1992; Aisa, 1997), por lo que no resulta práctica (Rolland *et al*, 1994) y su aplicación se limita a laboratorios altamente especializados (Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b).

En la actualidad se están desarrollando nuevos métodos de diagnóstico más rápidos y eficaces, como la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** (Berrahal *et al*, 1996; Vesco *et al*, 1997; Osman *et al*, 1997; Piarroux, 1997; Ferrer, 1997b), que utilizan indicadores diseñados a partir de secuencias conservadas en el DNA de los minicírculos del kinetoplasto (Bhattachayra *et al*, 1996; Barker *et al*, 1997) o sondas de DNA específicas de especie (Das Gupta *et al*, 1991; Pearson *et al*, 1996); técnicas que permiten detectar cantidades muy pequeñas de parásitos en el torrente sanguíneo (Berrahal *et al*, 1996; Bhattachayra *et al*, 1996) o en médula ósea y que podrían ser útiles, además, en la detección de infección en animales clínicamente curados tras la terapia específica (Roura *et al*, 1997; Steuber *et al*, 1997).

Ocasionalmente, algunos autores han realizado el diagnóstico basándose en la buena respuesta al tratamiento específico cuando el resultado parasitológico por punción de médula ósea fue negativo (Cambronero *et al*, 1983).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y CONCURRENCIAS

Debido a la gran variedad de síntomas que pueden aparecer en el curso de la leishmaniosis canina, a menudo, resulta necesario hacer el **diagnóstico diferencial** con otras muchas patologías, principalmente, otras **dermatosis** y otras **enfermedades crónicas** y caquectizantes (Franc, 1993).

El adelgazamiento y abatimiento pueden aparecer en otros procesos como parasitosis, anemia, carencias alimentarias, enteropatías, neoplasias, etc (Bourdoiseau, 1993).

Los síntomas dermatológicos son, a veces, muy equívocos y es necesario diferenciarlos de enfermedades cutáneas (Slappendel, 1988) que cursan como dermatosis descamativas no pruriginosas (adenitis sebácea granulomatosa idiopática (Kontos *et Koutinas*, 1993), tiñas, demodicosis, procesos queratoseborreicos) (Bourdoiseau, 1993) o como dermatosis ulcerativas (dermatitis acral por lamido, neoplasia, granulomas micóticos). En las formas nodulares el diagnóstico diferencial incluye quistes cutáneos, mastocitoma y linfoma cutáneo, mientras que en las formas pustulares incluye pénfigo foliáceo, pénfigo eritematoso, dermatosis pustular subcorneal y pustulosis eosinofílica estéril (Ferrer *et al*, 1988b; Dow, 1995). En casos en los que se detectan lesiones nodulares en mucosas puede ser necesario el diagnóstico diferencial con granulomas eosinofílicos o micobacterianos, micosis generalizada, neoplasia e, incluso, con tumor venéreo transmisible (Sánchez Botija, 1936; Font *et al*, 1996b).

La epistaxis es común a otras patologías como tumores nasales, ehrlichiosis, etc (Schaer *et al*, 1985; Kontos *et Koutinas*, 1993; Bourdoiseau, 1993; Cairó, 1994; Sainz, 1996).

Es importante tener presente el lupus eritematoso sistémico (LES) en el diagnóstico diferencial de la leishmaniosis (Ferrer *et al*, 1988b; Bourdoiseau, 1993). A menudo, resulta difícil distinguir estos dos procesos ya que ambas son enfermedades multisistémicas que típicamente se presentan con una historia y un cuadro clínico similares (Kontos *et Koutinas*, 1993). Esta confusión se acentúa ante el hecho de que la incidencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en perros leishmaniósicos es relativamente alta (Slappendel, 1988; Lucena *et al*, 1996). La toma de biopsias de piel, para su estudio histopatológico, ayuda a diferenciar estas dos enfermedades debido a la presencia de vesículas suprabasales (dermatitis hidrópica interfase) con o sin engrosamiento de la membrana basal en el LES frente a la dermatitis granulomatosa perianexal de la leishmaniosis (Kontos *et Koutinas*, 1993).

También hay que tener en cuenta el diagnóstico diferencial con desórdenes endocrinos, otros procesos infecciosos y enfermedades mielo y linfoproliferativas (Slappendel, 1988).

En medicina humana el diagnóstico diferencial debe hacerse con salmonelosis, brucelosis, tuberculosis o histoplasmosis que pueden presentarse como esplenomegalias febriles (Vitoria, 1984).

Por otro lado, hay que contar siempre con la posibilidad de **conurrencia con otras patologías**, muy especialmente si tenemos en cuenta la larga duración que puede llegar a tener la leishmaniosis. La depresión en la inmunidad mediada por células inducida por *Leishmania* podría explicar por qué la demodicosis (Sánchez Botija, 1936; Keenan *et al*, 1984; Lamothe, 1997b), dermatofitosis (Cabassu *et al*, 1988a) y otras enfermedades hemoparasitarias (como ehrlichiosis (Schaer *et al*, 1985; Varela, 1992; Sainz *et al*, 1993; Tesouro *et al*, 1995b), filariosis (Sánchez Botija, 1936; Wohlsein *et al*, 1996) y piroplasmosis (Varela, 1992; Núñez-Torrón *et al*, 1996)) se asocian con frecuencia a la leishmaniosis (Kontos *et al*, 1993).

Otros procesos como infecciones bacterianas cutáneas (Cabassu *et al*, 1988a), tuberculosis (Sánchez Botija, 1936), hipotiroidismo y tumores linfoides (Cairó *et al*, 1991), también se han visto asociados con alguna frecuencia a la enfermedad que nos ocupa.

TRATAMIENTO

Actualmente, no está claro qué agente o combinación de agentes, dosis o duración de la terapia son los más efectivos frente a la leishmaniosis (Moss *et al*, 1992; Alvar *et al*, 1997). Por este motivo, son muchos los fármacos relacionados con el tratamiento de esta enfermedad; desde los que ya han dejado de emplearse hasta los que, todavía hoy, se encuentran en fase experimental. Dentro de esta amplia batería de fármacos se incluyen agentes específicos frente a *Leishmania spp.*, moduladores del sistema inmunitario (inmunoestimulantes e inmunosupresores) y medicamentos utilizados como terapia de apoyo para resolver complicaciones que, en ocasiones, se asocian a este proceso.

ANTIMONIALES

A principios de siglo empiezan a utilizarse los antimoniales en el tratamiento de la leishmaniosis visceral, inicialmente, en su forma trivalente como el *tártaro emético* (introducido en Italia por Di Cristina y Caronia en 1915), el *antimosán* y el *neoantimosán* (Botet *et al*, 1993). Su elevada toxicidad hace que el uso de éstos se desplace en favor de los antimoniales pentavalentes (Gonzalez, 1955; Velasco, 1987), tales como el *estibosán*, *neostibosán* y *solustibosán* (empleado por primera vez en el tratamiento de la leishmaniosis visceral en India y China en 1937) (Croft, 1988; Botet *et al*, 1993) y, posteriormente, el *antimoniato de N-metil glucamina* o *antimoniato de meglumine* (Glucantime®) y el *estibogluconato de sodio* (Pentostam®) que, en la actualidad, continúan siendo los **fármacos de elección** en el tratamiento de esta enfermedad (Euzeby, 1988; Slappendel *et al*, 1990; Moss *et al*, 1992; Botet *et al*, 1993; Kontos *et al*, 1993; Tesouro *et al*, 1995c; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b). El primero se comercializa en zonas latinas y francófonas, mientras que el segundo se distribuye preferentemente en países anglosajones (Quilici *et al*, 1988; Lagardere *et al*, 1992).

ANTIMONIATO DE MEGLUMINE Y ESTIBOGLUCONATO SODICO

El Glucantime® es una solución al 33% de antimonio de N-metil glucamina (o de meglumine) que contiene un 28.35% de antimonio pentavalente (Sb^{5+}). Por su parte, el Pentostam® está compuesto por estibogluconato de sodio en una solución al 10% de antimonio pentavalente (Quilici *et al*, 1988).

Estos dos medicamentos son muy parecidos en su eficacia y toxicidad (Lagardere *et al*, 1992); la diferencia principal radicaría en la concentración de Sb^{5+} que hay en cada uno de ellos (100 mg Sb^{5+} /ml en el Pentostam® y 85 mg Sb^{5+} /ml en el Glucantime®).

Sin embargo, el examen del contenido en antimonio pentavalente y trivalente (Sb^{3+}) de ambos productos, mediante técnicas de determinación específicas, ha desvelado la presencia de concentraciones de Sb^{3+} superiores a las declaradas por los fabricantes, así como la existencia de Sb^{3+} en todas las ampollas analizadas (Franco *et al*, 1995).

Mecanismo de acción:

El mecanismo de acción de los antimoniales no es, todavía hoy, bien conocido pero parece que estos compuestos destruyen las leishmanias bloqueando la formación de GTP y ATP (Berman *et al*, 1985b; Berman *et Grogl*, 1989; Ferrer, 1992) inhibiendo dos enzimas dentro del metabolismo del parásito: la fosfofructoquinasa (Euzéby, 1982; Velasco, 1987; Berman *et Grogl*, 1989; Franc, 1993) y la piruvatodehidrogenasa (Euzéby, 1982; Franc, 1993).

Tampoco gran cosa se sabe acerca de su cinética, metabolismo y cantidad de antimonio (Sb) que se reduce a la forma trivalente, considerada mucho más activa que la pentavalente (Strobel *et al*, 1979; Velasco, 1987; Tassi *et al*, 1994) ya que, en perros, no existen estudios rigurosos sino sólo datos parciales sobre estos aspectos (Ferrer, 1992).

Tassi y col. (1994) realizan un ensayo sobre **farmacocinética antimonial** en el que se utiliza Glucantime® en perros sanos en una única dosis de 25.6 mg Sb^{5+} /kg (0.3 ml de Glucantime®/kg) por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM) y subcutánea (SC). Este ensayo refleja cómo con la administración endovenosa, la concentración máxima de Sb en suero se obtiene con gran rapidez (a los 5 minutos), pero los valores caen por debajo de los mínimos de detección en tan sólo 2 horas. Por vía IM, el pico máximo se consigue entre los 90 y 120 minutos, manteniéndose luego en una meseta durante 1 ó 2 horas, para alcanzar el mínimo de detección a las 4 horas post-inyección. En aplicación SC los valores más altos se logran entre las 3 y las 5 horas; no aparece meseta pero estos valores disminuyen muy lentamente hasta caer por debajo del límite de detección de Sb 18 horas después de haber sido administrado el Glucantime®. Este experimento demuestra que las concentraciones de Sb que se alcanzan en sangre son similares administrando la droga intramuscular o subcutáneamente. Sin embargo, la persistencia de antimonio en el organismo es sensiblemente mayor si se emplea la vía SC, lo que permitiría sugerir ésta última como la más conveniente (Tassi *et al*, 1994).

Valladares y col. (1996) llegaron a resultados parecidos, tras llevar a cabo un experimento de semejantes características, aunque las concentraciones plasmáticas de Sb fueron de tres a cuatro veces más bajas que las detectadas por Tassi y col. (1994). Además, constataron que el 80% de la droga fue excretada durante las primeras nueve horas, independientemente de la vía de administración (Valladares *et al*, 1996).

En cualquier caso, el método de detección de antimonio seguido en estos ensayos no distingue entre las formas tri y pentavalente, lo que impide conocer la cantidad de este elemento que se reduce a la forma activa. En consecuencia, no se puede llegar a una conclusión definitiva sobre la eficacia del Glucantime®, en el tratamiento de la leishmaniosis canina, en función de la vía de administración. Sería necesario investigar la cinética del Sb tras la aplicación de dosis múltiples, la cantidad de Sb⁵⁺ que se reduce y la distribución de sus concentraciones en los distintos órganos (en los que podría ser más fácil alcanzar al parásito) (Tassi *et al*, 1994).

En el hombre, Chulay y col. (1988) han puesto de manifiesto la notable similitud entre la farmacocinética del antimonio de N-metil glucamina y la del estibogluconato sódico cuando ambos productos se administran a dosis equivalentes de antimonio pentavalente. Esto podría explicar la mayor incidencia de efectos colaterales en pacientes tratados con las posologías propuestas por los fabricantes de Glucantime®, pues el contenido en Sb⁵⁺ de las dosis diarias recomendadas son de 1.7 a 2.8 veces mayores que las aconsejadas para el Pentostam®.

Estos autores han observado la existencia de una acumulación de la droga en el organismo a lo largo del tratamiento. Así, los individuos sometidos a una terapia antimonial de 10 mg de Sb⁵⁺/kg/día vía IM durante 30 días, presentaron un aumento gradual en la concentración nadir (pre-inyección) de antimonio que llegó a ser cuatro veces mayor al final del tratamiento (Chulay *et al*, 1988).

Por otra parte, tras la administración de Pentostam® IM (600 mg de Sb⁵⁺), en pacientes humanos con leishmaniosis cutánea, parece existir una buena penetración de antimonio en piel (sana o con lesiones) y, además, sería retenido durante más tiempo en este tejido que en la sangre (Al Jaser *et al*, 1995).

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la presencia de antimonio trivalente en los preparados antimoniales, detectada por algunos investigadores, destaparía cuestiones importantes concernientes a la estabilidad y estandarización del producto, así como al impacto que podría tener este hallazgo en la interpretación de estudios clínicos y farmacocinéticos (Franco *et al*, 1995).

Experimentalmente *in vivo* los antimoniales han mostrado su actividad frente a *L. donovani* (Troter *et al*, 1980) y *L. infantum* (Buffet *et al*, 1996). *In vitro* se ha evidenciado una mayor sensibilidad a los antimoniales pentavalentes por parte de los amastigotes en comparación con los promastigotes de *L. infantum* (Méndez, 1997), *L. donovani* (Epheros *et al*, 1997) y *L. tropica*. La efectividad de los antimoniales no sólo sería dosis-dependiente (Eslami *et al*, 1996), sino que dependería también de la cepa (Fuéri *et al*, 1997; Epheros *et al*, 1997) y de la fase de crecimiento en la que se encontrara el parásito dentro del macrófago en el momento de instaurar la terapia, siendo particularmente efectivo en la fase proliferativa (Eslami *et al*, 1996).

Según algunos autores los antimoniales serían más activos frente a los amastigotes extracelulares, durante los cortos momentos en que pasan de una célula a otra (Mattock *et Peters*, 1975), mientras que otros han sugerido que los macrófagos podrían concentrar o metabolizar estas sustancias para aumentar su toxicidad (Berman *et Wyler*, 1980). Estudios recientes, no obstante, indican que la susceptibilidad a estos compuestos es macrófago-independiente (Epheros *et al*, 1997).

Posología:

Los protocolos terapéuticos (dosis, vía de administración, pauta y duración del tratamiento) varían considerablemente de unos autores a otros (tanto en medicina humana (Gradoni *et al*, 1995) como en medicina veterinaria (Tesouro *et al*, 1995c; Ferrer, 1997b)) debido, como ya se ha mencionado, al desconocimiento que sobre la farmacocinética y metabolismo de los antimoniales existe aún en nuestros días.

Las dosis de Glucantime® que habitualmente se utilizan en el tratamiento de la leishmaniosis canina están en torno a los 100 mg de antimonio de N-metil glucamina/kg (equivalente a 28.35 mg Sb⁵⁺/kg) en inyección diaria (Mancianti *et al*, 1988; Slappendel, 1988; Tassi, 1989; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992; Brandonisio *et al*, 1996; Denerolle, 1996) pero también encontramos quienes duplican (Bussieras, 1977b; Rigal *et al*, 1983; Martínez *et Lloret*, 1992; Denerolle, 1996) o, incluso, triplican (Euzéby, 1988; Kontos *et Koutinas*, 1993) estas dosis administrándolas en días alternos.

Por su parte, el Pentostam® suele emplearse a dosis más bajas (alrededor de 10-20 mg Sb⁵⁺/kg) (Reiter *et al*, 1985; Reusch *et Reiter*, 1987; Zijlstra *et al*, 1993) aunque, experimentalmente en perros, se ha administrado a dosis superiores (50 mg Sb⁵⁺/kg) con buenos resultados (Reiter *et al*, 1985).

Los antimoniales se aplican parenteralmente (Berenger, 1988), ya que son inactivos por vía oral (Croft, 1988; Denerolle, 1996). Algunos prefieren la vía intravenosa (IV) (Kontos *et Koutinas*, 1993) para evitar los posibles efectos colaterales derivados de la inyección intramuscular (IM), como formación de abscesos y fibrosis secundaria en el lugar de inoculación (Longstaffe *et Guy*, 1986; Slappendel, 1988) o, en pacientes con una importante trombocitopenia, para impedir posibles hemorragias musculares debidas al traumatismo producido por la penetración de la aguja (Euzéby, 1982).

Aun con este riesgo, la vía intramuscular se utiliza con tanta o más frecuencia que la endovenosa (Bussieras, 1977b; Euzéby, 1982; Rodríguez *et al*, 1984; Croft, 1988; Tesouro *et al*, 1995c; Brandonisio *et al*, 1996). En el departamento de Patología Animal II de nuestra Facultad, la vía IM ha sido la más empleada hasta hace muy pocos años, entre otras razones porque permite que el tratamiento sea aplicado por los dueños de los perros enfermos. Los efectos secundarios inherentes al empleo de esta vía han sido escasos y sólo, en algunas ocasiones, se ha observado tumefacción local en el punto de inyección que remite al suspender la administración de Glucantime® en la zona afectada (Tesouro *et al*, 1995c).

Aunque hasta hace unos años las referencias relativas al empleo de la vía subcutánea (SC) eran muy escasas (Bergeaud, 1988; Slappendel, 1988; Tesouro *et al*, 1995c), lo cierto es que cada vez son más los que se inclinan por el uso de esta vía (Roze *et Pages*, 1994; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b), inducidos probablemente por los resultados de estudios farmacocinéticos recientes que sugieren que esta forma de administrar los antimoniales sería la más conveniente, pues la permanencia de Sb en el organismo es superior a la que proporciona la vía IV y su aplicación comporta menos riesgos de irritación local que la vía IM (Tassi *et al*, 1994; Valladares *et al*, 1996).

Algunos, siguiendo las indicaciones del laboratorio fabricante (Guía de Productos zoonosanitarios Veterindustria, 1994), diluyen previamente el antimonial en suero fisiológico (Crende *et al*, 1992). Al igual que ocurre cuando se elige la vía IM, la medicación puede ser administrada por el propietario y, además, es menos dolorosa y se reduce el riesgo de tumescencia o enquistamiento, aunque no se elimina por completo (Slappendel, 1988).

Curiosamente, hemos encontrado un caso en el que se empleó Glucantime® vía IM (a dosis de 100 mg de antimoniato de meglumine/kg/día) y oral (1.5 g/día) conjuntamente. Se trataba de un pastor alemán en el que el signo primario de la enfermedad era una diarrea crónica. La evolución fue favorable (Ferrer *et al*, 1991).

A pesar de la ausencia de estudios al respecto, se ha sugerido la vía intrarrectal como alternativa a la inyección parenteral de los antimoniales, particularmente en niños, suministrando el medicamento previamente diluido en solución salina a través de un catéter (Marsden, 1996).

También se ha hecho referencia al uso de estas drogas en aplicación tópica (intradérmica sub o paralesional (Quiles *et al*, 1979)) en nódulos cutáneos, con algún éxito (Slappendel *et Greene*, 1990). La administración intralesional de estibogluconato sódico en días alternos o una vez por semana, en leishmaniosis cutánea, parece más eficaz que los tratamientos locales diarios (Tallab *et al*, 1996).

La pauta y duración del tratamiento son los puntos en los que encontramos las mayores divergencias dentro de la bibliografía consultada. Las pautas varían desde 1 hasta 3 ciclos, con una duración por ciclo de 5 a 60 días e intervalos de descanso entre ellos no inferiores a 7 días ni superiores a un mes (Rigal *et al*, 1983; Longstaffe *et Guy*, 1986; Mancianti *et al*, 1988; Berenger, 1988; Euzaby, 1988; Slappendel, 1988; Tassi, 1989; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992; Martínez *et Lloret*, 1992; Roze *et Pages*, 1994; Wasunna *et al*, 1995; Tesouro *et al*, 1995c; Denerolle, 1996).

Con todo, los **protocolos más frecuentemente seguidos** para el tratamiento de la leishmaniosis canina utilizan en torno 20-30 inyecciones de antimoniato de meglumine (SC, IM o IV) a dosis de 100 mg/kg en aplicación diaria (Slappendel *et Greene*, 1990; Cairó *et Font*, 1991; Franc, 1993; Gascón, 1994; Denerolle, 1996), en días alternos (Bergeaud, 1988; Liste *et Gascón*, 1994; Font *et al*, 1996b) o con intervalos de descanso de 10-15 días (Mancianti *et al*, 1988; Ferrer, 1992; Brandonisio *et al*, 1996). De todos modos, pautas en las que se emplean concentraciones más altas de antimonio con una duración parecida, han mostrado su eficacia terapéutica con una toxicidad similar a la que producen las dosis habitualmente empleadas (Euzaby, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992; Alvar *et al*, 1994; Poli *et al*, 1997).

Mendoza y col. (1983), por su parte, con dosis claramente inferiores a 100 mg de antimonio de meglumine/kg (1 amp/día en un dalmata adulto) necesitaron 3 ciclos de 33, 37 y 80 días para conseguir la remisión clínica del animal (Mendoza *et al*, 1983).

El protocolo recomendado por la OMS para el tratamiento del kala-azar es: 20 mg Sb⁵⁺/kg/día, hasta un máximo de 850 mg, durante un mínimo de 20 días. El tratamiento debe continuar hasta dos semanas después de la curación parasitológica. La vía de administración puede ser intramuscular o intravenosa. La inyección IV debe hacerse lentamente (durante cinco minutos) con aguja fina (23-25 G; 0,6-0,5 mm.) para evitar todo riesgo de trombosis (OMS, 1990; Gradoni *et al*, 1995). Herwaldt y Berman (1992), basándose en su experiencia clínica y en otros estudios, son de la opinión de que la medicación debería administrarse sin límite máximo de dosificación, ya que la eficacia terapéutica es mejor y los efectos tóxicos no son significativamente superiores. Estos autores, además, recomiendan tratar la leishmaniosis visceral durante tres semanas (Herwaldt *et Berman*, 1992a).

Las dosis y pautas de administración de Glucantime® recogidas en la bibliografía difieren, a menudo, de las propuestas por el laboratorio productor tanto para el tratamiento de la leishmaniosis humana (60-100 mg/kg/día vía IM, en dos series de 12-15 inyecciones y un reposo de 15 días entre las dos series (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 1996) como canina (2 ó 3 tandas de 10-15 inyecciones, a dosis de 100-200 mg/kg/24-48 h vía IM, IV, intraperitoneal o SC, con intervalos de descanso de 10 días). El laboratorio recomienda utilizar, inicialmente, la mitad de la dosis e ir aumentándola progresivamente hasta la dosis aconsejada, particularmente cuando la perfusión renal está reducida (Guía de Productos Zoosanitarios Veterindustria, 1994).

Aunque en el kala-azar infantil esta pauta parece haber sido efectiva (Cambronero *et al*, 1983), según Denerolle (1996) la aplicación del protocolo del fabricante no resulta satisfactoria frente a la leishmaniosis canina, porque el número de inyecciones es insuficiente para obtener la curación clínica completa y en las recidivas su eficacia disminuye (Denerolle, 1996).

Efectos colaterales:

Pese a su mala fama, el Glucantime® y el Pentostam® podrían considerarse dos de los compuestos con menor toxicidad de entre todos los que hay disponibles en el mercado para el tratamiento de la leishmaniosis (Euzebay, 1982; Tassi, 1989) y, de hecho, suelen ser **bien tolerados** (Roze *et Pages*, 1994). Los efectos colaterales son normalmente reversibles y sólo en raras ocasiones es necesario interrumpir la terapia (Herwaldt *et Berman*, 1992a).

A pesar de las consecuencias nocivas de estos preparados sobre el riñón, descritas en humanos, los antimoniales muestran poca nefrotoxicidad en los perros. Excepcionalmente, algunos perros presentan intolerancia al Glucantime® que puede traducirse en una insuficiencia renal moderada y reversible tras suspender su administración (Naskidachvilli *et Peroux*, 1988; Denerolle, 1996).

Sin embargo, la experiencia cotidiana indica la preexistencia, casi sistemática, de una glomerulonefritis previa a la terapia. Sería la instauración del tratamiento, ante la ignorancia de esta situación, lo que haría que las lesiones renales se atribuyeran al Glucantime® (Denerolle, 1996). Es más, a pesar de que en medicina humana se desaconseja su empleo en tales circunstancias (Vitoria, 1984), el Glucantime® podría usarse en la leishmaniosis canina asociada a insuficiencia renal a dosis reducidas (Naskidachvilli *et Peroux*, 1988). Este tratamiento, combinado con una dieta adecuada y otras medidas de apoyo, sería capaz de proporcionar resultados alentadores, incluso en casos desesperados (Kontos *et Koutinas*, 1993).

Aun así, no hay que olvidar que todos los antimoniales son, en alguna medida, tóxicos pues provocan la unión de grupos sulfhidrilo (-SH) (Euzéby, 1982; Léonard *et Gerber*, 1996) y alteran la estructura terciaria de las proteínas, así como los lugares de acción de numerosas enzimas (Euzéby, 1982).

En consecuencia, a veces se presentarían signos de **estibointolerancia**, que se manifiestan tras las primeras inyecciones y remiten al suspender la terapia, o signos de **estibotoxicidad**, que aparecen al final del tratamiento (Tassi, 1989) y suelen ser el reflejo de una posología excesiva (Vitoria, 1984). Estos signos pueden consistir en fiebre y tos persistentes, mialgias, artralgias, vómitos y diarreas, hemorragias, dolores de cabeza, síncope, erupciones cutáneas, dolor abdominal, apatía, inapetencia, rigidez local y complicaciones renales o hepáticas (Vitoria, 1984; Rodríguez *et al*, 1984; Euzéby, 1988; Tassi, 1989; Mattot *et al*, 1992; Ferrer, 1997b; Aronson *et al*, 1997).

En medicina humana, la aparición de pancreatitis aguda (Barthet *et al*, 1994), con elevación de las enzimas pancreáticas (Aronson *et al*, 1997) (amilasa y lipasa), parece ser un efecto secundario al uso de antimoniales bastante habitual. Las náuseas, vómitos y dolor abdominal, observados con frecuencia tras la instauración de la terapia, podrían ser signos de una pancreatitis que suele remitir sin necesidad de interrumpir la terapia (Gasser *et al*, 1994).

También y como se ha dicho cuando hablamos de la posología, pueden aparecer abscesos o tumefacción local en el punto de inyección (Longstaffe *et Guy*, 1986; Roze *et Pages*, 1994; Denerolle, 1996). Asimismo, se ha puesto en evidencia una cierta cardiotoxicidad, tanto con el antimonio de meglumine (Mattot *et al*, 1992) como con el estibogluconato sódico, sobre todo, cuando se administran dosis elevadas (Herwaldt *et Berman*, 1992a). que, al igual que el resto de los efectos colaterales al tratamiento, suele ser reversible (Aronson *et al*, 1997).

Con el fin de limitar la aparición de estos efectos se ha propuesto la reducción de la dosis en las primeras inyecciones del tratamiento, ya que esto permitiría testar la susceptibilidad del sujeto y podría descubrir las posibles reacciones de intolerancia (Strobel *et al*, 1979).

Con cierta frecuencia, tras los primeros días de la instauración de la terapia, se produce un **empeoramiento del estado general** acompañado de postración (Franc, 1993; Denerolle, 1996) que resulta muy inquietante para el dueño. Esta exacerbación de los síntomas es imputable a la lisis de leishmanias que provocaría una liberación masiva de antígenos parasitarios (Bourdoiseau, 1993).

Paralelamente, estudios experimentales en hamsters (Pal *et al*, 1995) y en perros (Pospischil *et al*, 1987) han revelado aumentos del título de anticuerpos a los pocos días de iniciar el tratamiento, lo que ha sido igualmente atribuido a la liberación masiva de antígeno por la muerte de los amastigotes y la consiguiente estimulación del sistema inmunitario. Después, las tasas de anticuerpos descienden (Pal *et al*, 1995). Asimismo, el empeoramiento es, en la mayor parte de los casos, pasajero y permite la continuación del tratamiento (Bourdoiseau, 1993).

En medicina humana también se ha descrito esta intensificación de los síntomas, lo que tampoco implica la necesidad de interrumpir o alterar la terapia (Moss *et al*, 1992). Excepcionalmente, se han descrito cuadros severos con desarrollo de una coagulación intravascular diseminada (CID) en perros (Font *et al*, 1994) y en personas, que también se ha relacionado con una respuesta inmunitaria exagerada (Mesejo *et al*, 1993).

Por otro lado, se ha sugerido que la aparición de una toxicidad subaguda podría estar relacionada con la dosis total de antimonio diaria, ya que dosis de 20 mg Sb⁵⁺/kg tres veces al día provocan, casi siempre, malestar, náuseas y anorexia, cosa que normalmente no ocurre cuando se administra una sólo dosis diaria de 20 mg Sb⁵⁺/kg (Bryceson *et al*, 1985b).

Otra posible complicación post-terapéutica que hay que considerar es la aparición de nódulos cutáneos granulomatosos (Rosychuck *et al*, 1991; Slappendel, 1988), uveítis y/o queratoconjuntivitis ulcerosa (Slappendel, 1988) en perros, durante el tratamiento con Glucantime® y que se han descrito como reacciones de hipersensibilidad al parásito. La estiboterapia parece desviar el estado inmunopatológico del animal de anérgico hacia un estado alérgico, sin que se alcance la curación definitiva (Slappendel, 1988 *et al* Greene).

Estas situaciones son comparables a la leishmaniosis dérmica post-kala-azar (PKDL) que se da en el hombre (Slappendel, 1988) y que se caracteriza por la aparición de lesiones maculopapulosas o nodulares en la piel durante el tratamiento o, incluso, varios meses después de haberse finalizado la terapia (Sierra, 1981; El Hassan *et al*, 1992; Ramesh, 1996; Gasim *et al*, 1997). Este tipo de lesiones difieren de la leishmaniosis cutánea autolimitante (botón de Oriente) en que la carga parasitaria es menor y en que no se produce necrosis de los macrófagos parasitados. Los pacientes adquirirían un grado de inmunocompetencia suficiente para eliminar una buena parte de los parásitos del organismo, pero serían incapaces de acabar por completo con la infección. La baja carga parasitaria sería tolerada y el proceso se cronificaría (El Hassan *et al*, 1992), pudiendo persistir durante más de 10 años (Ismail *et al*, 1997). Otras veces, se produce la curación espontánea, sin tratamiento, en unos pocos meses (Gasim *et al*, 1997).

Se desconoce por qué, tras la estiboterapia, las leishmanias aparecen en la piel y si el protozoo es totalmente eliminado o no de las vísceras (El Hassan *et al*, 1992). En hamsters experimentalmente infectados con *L. donovani*, Pal y col.(1989) han observado que, tras el tratamiento antimonial (estibogluconato sódico) y paralelamente a la reducción de los niveles de infección en hígado, bazo, médula ósea y otros órganos, parásitos viables e infectivos aparecen en piel y cavidad abdominal, de forma parecida a lo que ocurre en el hombre, lo que sugiere una migración de los microorganismos a lugares alternativos en respuesta a la terapia. Así, la leishmaniosis dérmica post-kala-azar podría ser el resultado de tal migración (Pal *et al*, 1989).

Se sospecha como posible factor en la patogenia de este proceso un tratamiento inadecuado del kala-azar (El Hassan *et al*, 1992). De todos modos, sería posible que una infección primaria débil confiriese inmunidad frente a las formas viscerotrópicas pero no frente a las formas dermatotrópicas de la enfermedad, ya que algunos pacientes sin historia previa de leishmaniosis clínica (y, por tanto, no tratados) desarrollan este tipo de lesiones (Haldar *et al*, 1989).

En torno a las particularidades que rodean a esta entidad, recientemente se ha postulado una nueva hipótesis que considera la presencia de leishmanias en localización cutánea parte de la historia natural del kala-azar. El parásito no provocaría una respuesta inflamatoria marcada, pero en algunos pacientes induciría la producción de IL-10 por los queratinocitos, lo que permitiría su supervivencia en la piel. Tras la terapia la respuesta inmunitaria pasaría de ser de tipo Th2 a una combinación de tipo Th1/Th2. Algunas de las células Th1 migrarían a la piel donde atacarían al protozoo, lo que podría ser causa de la inflamación cutánea y del desarrollo de PKDL (Gasim *et al*, 1997).

En relación con todo lo expuesto hay que tener en consideración el hecho de que, en la leishmaniosis, el parásito puede por sí mismo producir lesiones hepáticas y renales graves (Euzeby, 1982) y desencadenar fenómenos de hipersensibilidad, pues estos protozoos inician muchos procesos inmunológicos dentro del hospedador (Bergeaud, 1988; Rosyckuck *et White*, 1991; Varela, 1992); se comprende entonces que, en ocasiones, resulte prácticamente imposible determinar si los signos que aparecen son debidos a los efectos de la quimioterapia o a la acción de la propia *Leishmania* (Roze *et Pages*, 1994; Bourdoiseau, 1993).

Como dato anecdótico, pero que consideramos de gran interés en el estudio de la toxicidad de los antimoniales pentavalentes, citaremos un caso recogido en nuestra bibliografía en el que, por error, se administró Pentostam® a una mujer de 27 años con leishmaniosis cutánea a una dosis 10 veces superior a la habitualmente utilizada (143 mg Sb⁵⁺/kg en lugar de 14.3 mg Sb⁵⁺/kg) con este producto. La paciente entró en depresión profunda durante las cuatro horas de infusión de la droga. Una vez descubierto el error en la dosificación, la mujer fue hidratada intensamente y controlada cuidadosamente durante más de 48 horas. Los niveles séricos de ALT subieron 2.4 veces por encima de los valores normales, mientras que el recuento de glóbulos blancos (GB) descendió a 3700 GB/mm³. Ambos parámetros regresaron a sus niveles normales en poco tiempo y las lesiones cutáneas curaron sin tratamiento posterior. Así y aunque el estibogluconato de sodio se asocia, como ya ha sido mencionado, con una gran variedad de efectos secundarios, al menos en este caso, una única dosis muy elevada de la droga fue tolerada sin una toxicidad aguda seria (Herwalt *et Berman*, 1992b).

Por último, parece que los riesgos mutagénicos, carcinogénicos (Leonard *et Gerber*, 1996; Hantson *et al*, 1996) y teratogénicos de los antimoniales, de existir, serían poco importantes (Leonard *et Gerber*, 1996). En todo caso, es recomendable emplear estos medicamentos con precaución en pacientes con enfermedad hepática o renal severas y durante la gestación (Moss *et al*, 1992).

Respuesta al tratamiento:

La gran mayoría de los perros enfermos (exceptuando aquellos con fallo renal, afección hepática o gastroenteritis importantes) (Slappendel, 1988), muestran una mejoría clínica muy evidente acompañada, generalmente, de la remisión de los síntomas y lesiones en el curso del tratamiento (Slappendel, 1988; Ferrer, 1992; Kontos *et Koutinas*, 1993). Sin embargo, las recidivas ocurren en más del 75% de los animales durante los dos años siguientes (Giauffret *et al*, 1976; Catarsini, 1989; Slappendel *et Greene*, 1990; Ferrer, 1992) y, normalmente, los tratamientos son requeridos cada 6-9 meses, aunque se han recogido casos de aparente curación después de 5-7 años del último tratamiento aplicado (Longstaffe *et Guy*, 1986; Slappendel, 1988).

No se sabe todavía si una respuesta favorable al tratamiento con antimoniales pentavalentes depende de que se alcance un pico alto en la concentración del medicamento en el organismo o del **mantenimiento de concentraciones inhibitoras** durante la mayor parte del día. Esto último parece ser más importante en la consecución del éxito terapéutico en medicina humana (Tassi *et al*, 1994). Al menos, así lo reflejan estudios como el realizado por Chulay y col. (1983) que muestran cómo el tratamiento con estibogluconato sódico a dosis de 10 mg Sb⁵⁺/kg IV o IM cada 8 horas durante 10 días, es tan efectivo como la aplicación de una única dosis diaria de 10 mg Sb⁵⁺/kg durante 31 días en el tratamiento de la leishmaniosis visceral y, además, causa una desaparición más rápida de los parásitos en los aspirados esplénicos. En ningún caso se apreciaron signos de estibotoxicidad (Chulay *et al*, 1983).

Esto se corresponde con un ensayo reciente sobre farmacocinética antimonial en el que se administra antimoniato de N-metil glucamina en una única dosis de 100 mg/kg por vía IV,IM y SC a 6 perros (beagle) sanos. Según los resultados los autores sugieren la posibilidad de la aplicación de protocolos terapéuticos con dosificaciones más bajas del fármaco, administradas con más frecuencia (cada 8-12 horas) (Valladares *et al*, 1996). De este estudio Ferrer (1997) desprende que la dosis más adecuada de Glucantime® sería 75 mg/kg/12 h (Ferrer, 1997a).

Por su parte, Zijlstra y col.(1993) no han encontrado diferencias en la curación de enfermos de kala-azar utilizando Pentostam® a dosis de 10 mg Sb⁵⁺/kg/día durante 30 días, de 20 mg Sb⁵⁺/kg/día durante 15 días o de 20 mg Sb⁵⁺/kg/día durante 30 días, si bien la reducción de parásitos en las muestras esplénicas fue mayor en los pacientes que recibieron 20 mg Sb⁵⁺/kg/día. Aun así, la demostración de protozoos tras cualquiera de los tres protocolos no implicó necesariamente un fallo en la terapia, ya que los pacientes que mostraron una respuesta clínica favorable no solieron necesitar más tratamiento y los parásitos habían desaparecido de los aspirados de bazo después de un mes (Zijlstra *et al*, 1993).

En beagles experimentalmente infectados con *L.donovani* y, posteriormente, tratados con Pentostam® a dosis de 10 ó 50 mg Sb⁵⁺/kg/día en dos tratamientos de 10 días con un intervalo de descanso entre ellos de 10 días, Reiter y col.(1985) han observado una curación parasitológica del 100%. En los perros que recibieron 10 mg Sb⁵⁺/kg/12 horas, en un solo tratamiento de 10 días, se obtuvo la curación parasitológica en el 80% de los animales. Esto sugiere que el seguimiento de una terapia más corta a dosis bajas no es recomendable (Reiter *et al*, 1985).

En otro estudio realizado en personas en India, en el que se emplearon dosis de 10, 15 y 20 mg Sb⁵⁺/kg/día de Pentostam® durante 20 ó 40 días, se comprobó que la respuesta al tratamiento era mejor con las dosis más altas durante el periodo de tiempo más prolongado. Estos autores observaron que pacientes que no respondían inicialmente a la terapia, todos ellos con la enfermedad establecida durante mucho tiempo, llegaron a responder cuando se prolongó la duración del tratamiento (Thakur *et al*, 1988). Asimismo, en ratones BALB/c experimentalmente infectados con *L. infantum*, se ha observado que la reducción en el número de parásitos es dosis-dependiente en tratamientos antimoniales de igual duración (Buffet *et al*, 1996).

En esta línea, Alvar y col. (1997) en un trabajo de revisión, en el que queda patente que tratamientos prolongados (20 mg de Sb⁵⁺/kg/día durante 28 días o más) conducen a mayores proporciones de curación en individuos inmunocompetentes, sugieren que los pacientes VIH positivos con leishmaniosis visceral requerirían tratamientos más largos o a dosis superiores que los individuos inmunocompetentes para alcanzar curaciones parasitológicas aparentes (Alvar *et al*, 1997).

El empleo de dosis altas (por encima de 3000 mg de antimonio de meglumine/kg/ciclo de tratamiento), en la leishmaniosis canina, podría disminuir considerablemente el número de recidivas alargando el lapso de tiempo entre ellas (Kontos *et Koutinas*, 1993; Tesouro *et al*, 1995c).

Toda esta información, recogida de la literatura, parece sugerir que la consecución de una respuesta favorable con el tratamiento antimonial vendría determinada más por la **dosis total de fármaco** administrada, en cada tratamiento (dentro de unos márgenes bastante amplios de dosificación diaria y duración de la terapia), que por el protocolo terapéutico concreto utilizado (Tesouro *et al*, 1995c).

Por otra parte, parece que la **fase de la enfermedad** (Tesouro *et al*, 1995c) y la **situación clínica** del animal infectado, serían de suma importancia en la respuesta al tratamiento. Mancianti y col. (1988) lo corroboran tratando perros con distinta condición clínica (asintomáticos, oligosintomáticos y sintomáticos) con Glucantime® en uno o más ciclos (100 mg N-metil glucamina/kg/día durante 10 días, seguidos de 10 días de descanso y de 10 días más de tratamiento) (Mancianti *et al*, 1988). Los mejores resultados los obtienen con los animales asintomáticos (47.2% de curaciones clínicas y serológicas), mientras que la menor proporción de recuperaciones se dió entre los animales con signos viscerocutáneos importantes (11.1%). En cualquier caso, de entre los perros que no alcanzaron la curación, en el 90% de los asintomáticos se previno el desarrollo de la enfermedad y en el resto (oligosintomáticos y sintomáticos) se apreció una mejoría clínica y serológica, entre los 4 y los 24 meses posteriores al tratamiento.

Por último y dentro de la respuesta a la estiboterapia, resulta ineludible abordar un punto tan importante como es la **resistencia al tratamiento**. Las posibles explicaciones de los fallos clínicos y parasitológicos de la terapia antimonial incluyen diferencias inmunológicas, fisiológicas o farmacocinéticas del hospedador; factores nutricionales o predisposición genética del animal (Bryceson *et al*, 1985a) y diferencias en el grado de concentración del parásito en los distintos tejidos. También habría que tener en cuenta una posible resistencia inherente al parásito o una combinación particular de algunos o todos estos factores (Grogg *et al*, 1992).

En algunos estudios realizados en medicina humana no parece que las repetidas recidivas y las resistencias al tratamiento sean debidas, mayoritariamente, a una **falta de respuesta inmunitaria**, ya que el grado de inmunosupresión y la proporción en la recuperación de inmunoreactividad no difieren, en muchos casos, entre los pacientes que responden a la estiboterapia y los que no (Bryccson *et al*, 1985a).

Esto, sin embargo, se contradice con otras muchas evidencias (Berger *et Fairlamb*, 1992). Trabajos experimentales han demostrado que en ratones BALB/c infectados con *L.donovani* inmudeprimidos con prednisolona y tratados con Pentostam® se produce una menor supresión en la carga parasitaria hepática que en los no inmunodeprimidos, lo que sugiere que los mecanismos efectores inmunitarios se sumarían a la actividad del estibogluconato sódico (Iwobi *et al*, 1991). Además, se ha observado una mayor incidencia de recidivas en pacientes inmunodeprimidos que en inmunocompetentes (Ribera *et al*, 1996).

En hamsters infectados con *L.donovani* se observa una supresión de la respuesta inmunitaria, a medida que avanza la enfermedad, claramente reversible tras el tratamiento exitoso con estibogluconato sódico (Pal *et al*, 1995).

En el perro y como resultado de una quimioterapia efectiva de la leishmaniosis, los parásitos serían destruidos por los macrófagos estimulados por los linfocitos productores de IFN-gamma a través de un mecanismo NO-dependiente (Vouldoukis *et al*, 1996) y, además, se restablecería la actividad parasiticida de neutrófilos y monocitos (Brandonisio *et al*, 1996).

De igual forma, Nabors y Farrell (1996) advierten, en ratones con leishmaniosis (*L.major*) y tras una terapia antimonial eficaz, una desviación de la respuesta celular Th2 hacia una respuesta Th1. La existencia de una cierta activación de las células Th1, previa a la instauración de la terapia, sería crítica para la curación ya que, en los ratones previamente tratados con anti-IFN-gamma y, por tanto, con una respuesta Th2 más exagerada, la estiboterapia no fue efectiva. El hecho de que fuera necesario un tratamiento antimonial prolongado para conseguir el desarrollo de una respuesta Th1 y una curación sin recidiva, en ratones con infección establecida y progresiva, indica que los niveles de antígeno deben permanecer bajos durante un largo periodo de tiempo para que la respuesta Th2 cambie, de forma efectiva, a Th1 en ausencia de una intervención inmunológica (Nabors *et Farrel*, 1996).

Parece, por tanto, que niveles altos de antígeno durante la infección favorecen la perpetuación de la respuesta celular Th2 mientras que, en presencia de niveles más bajos de antígeno, la respuesta inmunitaria sería mas susceptible de manipulación permitiendo que pueda darse una activación de tipo Th1. Esta respuesta Th1, desarrollada como resultado de la terapia, fue suficiente para proteger a los ratones de una nueva infección. Todo esto sugiere que los pacientes difíciles de tratar satisfactoriamente, incluso con cursos largos de estiboterapia, serían buenos candidatos para una terapia combinada de antimoniales y citoquinas inmunomoduladoras, como IFN-gamma o IL-2, para ajustar la polarización de la respuesta celular hacia el polo Th1 (Nabors *et Farrel*, 1996).

En medicina humana también se ha apreciado cómo el fracaso del tratamiento antimonial en pacientes con leishmaniosis (*L.infantum*) estaría relacionado con una inmunidad celular y una producción de IFN-gamma deficientes (Piarroux *et al*, 1996).

Otra posibilidad, que se baraja como causa frecuente en la falta de respuesta a la terapia, es la génesis de **resistencias por parte del parásito** como consecuencia de **tratamientos inadecuados en dosis y/o duración** (Bryceson *et al*, 1985b; Grogl *et al*, 1989; Grogl *et al*, 1992).

Aunque en un estudio reciente se ha puesto de manifiesto la eficacia de una dosis mensual de Glucantime® o Pentostam® (850 mg de Sb⁵⁺/paciente) para retrasar las recidivas en individuos VIH positivos (Ribera *et al*, 1996), lo cierto es que se ha observado cómo enfermos que inicialmente parecen responder a los antimoniales, ante una recidiva, se vuelven refractarios a la estiboterapia (Piarroux, 1996). Además, *in vitro* se ha comprobado que la sensibilidad al antimonio de meglumine, por parte de distintas cepas de *L.infantum*, decrece progresivamente en pacientes con recidivas repetidas tratadas con este antimonial (Faraut-Gambarelli, 1997).

Algunos autores muestran su preocupación ante esta situación, porque sospechan que el actual incremento en la falta de respuesta al tratamiento en personas pueda deberse, cuando menos parcialmente, al tratamiento indiscriminado y repetido de los perros, muchos de los cuales podrían quedar como reservorios permanentes de leishmanias no susceptibles a las drogas utilizadas en medicina humana para combatir esta enfermedad. Por eso, sugieren que el tratamiento debería limitarse a los animales asintomáticos, que no son infectantes para los flebotomos y en los que la terapia puede alcanzar altas cuotas de curación (Gradoni *et al* 1988; Mancianti *et al*, 1988). Otros, no obstante, demuestran que perros asintomáticos pueden permanecer infectantes para *Phlebotomus perniciosus* (Molina *et al*, 1994a) incluso tras la estiboterapia (Alvar *et al*, 1994), con el inconveniente de que los protozoos podrían desarrollar estiborresistencia (Gramiccia *et al*, 1992).

De hecho, en perros se han observado leishmanias en biopsias de piel aparentemente sana (Sánchez Botija, 1936) y, particularmente, Abranches y col. (1991) han podido constatar la presencia de amastigotes en un 20% de muestras cutáneas sin lesiones evidentes (Abranches *et al*, 1991a). Estudios realizados con técnicas más sensibles, como la PCR (empleando muestras procedentes de la piel y de la conjuntiva), revelan que más del 50% de los perros clínicamente sanos, en zonas endémicas, podrían considerarse portadores asintomáticos de la enfermedad, cifra que disminuiría tras la estiboterapia (Berrahal *et al*, 1996). Además, la detección de parásitos viables en la piel de hamsters experimentalmente infectados tras un tratamiento antimonial, sugiere la posibilidad de que hospedadores tratados actúen como reservorios potenciales en la transmisión del parásito (Pal *et al*, 1989).

Grogl y col. (1992) sostienen que las resistencias al tratamiento con Sb⁵⁺ pueden ser igualmente debidas a factores independientes del parásito (interacción droga-hospedador) (Grogl *et al*, 1992). De hecho, Al Jassar y col. (1995) han puesto de manifiesto que pacientes humanos, con leishmaniosis cutánea y tratados con 600 mg de estibogluconato sódico, metabolizan de distinta forma el antimonial (unos lo eliminan más rápidamente que otros). Esto dependería primariamente de las características farmacocinéticas del antimonio en cada paciente, ya que todos ellos (aparte de la lesión cutánea) estaban aparentemente sanos (Al Jasser *et al*, 1995).

Aun teniendo en cuenta todo lo anterior, en caso de una respuesta nula o desfavorable al tratamiento debe revisarse el diagnóstico, evaluar las funciones hepática y renal y considerar la posibilidad de enfermedades asociadas (Cairó *et al*, 1991; Núñez-Torrón *et al*, 1996).

En aquellos pacientes que presentan una pobre respuesta a la terapia y persistencia de parásitos tras un mes de tratamiento, debe sospecharse de una enfermedad concurrente, ya que el éxito en el tratamiento del kala-azar no sólo depende del protocolo terapéutico elegido sino también del diagnóstico e inmediato tratamiento de enfermedades concurrentes como tuberculosis (Bryceson *et al*, 1985a; Zijlstra *et al*, 1993).

DIAMIDINAS

Las diamidinas se utilizan comúnmente en la tripanosomiasis y son consideradas, por muchos, drogas de segunda elección en la terapia contra la leishmaniosis cuando el tratamiento con antimoniales resulta ineficaz (Quiles *et al*, 1979; Euzeby, 1982; Bryceson *et al*, 1985b).

PENTAMIDINA

Muchas son las diamidinas aromáticas que se han ensayado para el tratamiento de esta enfermedad (Balañas *et al*, 1991; Carrera *et al*, 1994; Méndez, 1997) pero la más empleada es la pentamidina (Pentacarinat® (Piarroux *et al*, 1996) o Lomidine® (Euzeby, 1988)). Sin embargo, no parece que los veterinarios clínicos de pequeños animales se inclinen por el empleo de este medicamento. Concretamente en nuestro país las referencias a su empleo son escasas y los resultados obtenidos poco satisfactorios (Crende *et al*, 1992; Tesouro *et al*, 1995c).

Mecanismo de acción:

La actividad tripanocida de la pentamidina parece ser debida a una perturbación en el metabolismo de las proteínas y ácidos nucleicos: interacción con el RNA y desorganización del DNA con el que las diamidinas forman complejos; además, éstas inhiben la síntesis de fosfolípidos (Euzeby, 1982).

Experimentalmente, en perros infectados con *L.tropica*, la pentamidina muestra actividad sobre las mitocondrias (tumefacción), el kinetoplasto (desintegración en filamentos), la bolsa flagelar (dilatación y sobrecarga de corpúsculos procedentes de su pared) y los ribosomas (reducción del número) (Euzeby, 1988). Ensayos *in vitro* revelan una mayor sensibilidad por parte de los amastigotes que por los promastigotes de *L.donovani* y *L.tropica* hacia la pentamidina (Berman *et al*, 1980). Por otro lado, con ésta y otras diamidinas se ha observado inhibición del crecimiento de promastigotes (Balaña *et al*, 1991; Carrera *et al*, 1994) y amastigotes de *L.infantum* (Méndez, 1997).

Posología:

La **dosis** de pentamidina más habitualmente empleada, tanto en perros como en el hombre, es de 4 mg/kg por vía IM profunda (Bryceson *et al*, 1985b; Euzeby, 1988; OMS, 1990; Lagardere, 1992; Mishra *et al*, 1992; Franc, 1993; Bourdoiseau, 1993; Rhalem *et al*, 1997).

Las **pautas de administración** que se siguen son: 2 ó 3 inyecciones/semana durante 4 a 7 semanas (Euzeby, 1982; Rodríguez *et al*, 1984; Rhalem *et al*, 1997) ó 20 inyecciones en días alternos (Mishra *et al*, 1992). La OMS recomienda una duración del tratamiento, en el kala-azar, de 5 a 25 semanas, o incluso más, según la respuesta del paciente a la terapia con este medicamento (OMS, 1990).

Efectos colaterales:

En principio, la pentamidina no es un fármaco de primera elección en el tratamiento de la leishmaniosis, ni en animales ni en personas, debido a que su toxicidad es superior a la de los antimoniales pentavalentes, su eficacia (a las dosis recomendadas) es menor (Hanson *et al*, 1977; Quiles *et al*, 1979; OMS, 1984; Croft, 1988; Lagardere *et al*, 1992) y la duración de la terapia es más larga (Croft, 1988).

Algunos de sus **efectos tóxicos** son: nefritis, hepatitis, dolor abdominal, náuseas, vómitos, hipotensión, síncope (OMS, 1984; Bryceson *et al*, 1985b) y shock mortal (Denerolle, 1996). También se ha descrito la aparición de mialgias, fiebre, dolores de cabeza e hipoglucemia (Soto *et al*, 1994). La inyección de pentamidina es altamente irritante incluso cuando se aplica en óptimas condiciones de asepsia y provoca, con relativa frecuencia, la aparición de abscesos musculares (Euzeby, 1982; Bourdoiseau, 1993) o, incluso, necrosis (Denerolle, 1996); en otras ocasiones sólo produce dolor local (Soto *et al*, 1994). Para disminuir tales riesgos, se recomienda cambiar el lugar de inyección en cada administración (Euzeby, 1982; Franc, 1993).

Respuesta al tratamiento:

Aunque las diamidinas muestran su eficacia en el tratamiento de esta zoonosis en caso de estiborresistencia, también se conocen casos de resistencia a estos fármacos, tanto en animales (Euzeby, 1982) como en personas (Bryceson *et al*, 1985b), y los resultados que se obtienen son, en opinión de algunos, muy irregulares (Rodríguez *et al*, 1984).

Hay autores que recomiendan la asociación de la pentamidina con antimoniales, especialmente en casos de una respuesta ineficaz a estos últimos. Las pautas que, en este sentido, hemos encontrado en la bibliografía incluyen la administración de ciclos de 10-15 inyecciones, de cada uno de estos dos principios activos, aplicadas de manera intercalada o consecutivamente (Euzeby, 1988; Piarroux *et al*, 1996).

No obstante, Crende y col. (1992) no han obtenido buenos resultados con este tipo de asociación (2 mg de pentamidina/kg/48 h, en series de 10-15 inyecciones intercaladas con 10-15 inyecciones de Glucantime® a dosis de 40-60 mg de antimonio de meglumine/kg/48 h) en el tratamiento de la leishmaniosis canina (Crende *et al*, 1992).

La pentamidina también ha sido empleada en infusión intravenosa a la dosis de 4 mg/kg tres veces por semana hasta la desaparición de los parásitos de los aspirados esplénicos. Este protocolo, seguido de la administración de estibogluconato sódico (20 mg Sb⁵⁺/kg/día, IM, durante 20 días), parece ser más efectivo que la utilización de pentamidina sola (menos recidivas) y menos tóxico que la combinación simultánea de ambos medicamentos (menos muertes), en pacientes con kala-azar resistente a los antimoniales (Thakur *et al*, 1991).

ANTIBIOTICOS DERIVADOS DE LOS POLIENOS

Dentro de este grupo se incluyen una gran cantidad de fármacos que, aunque tradicionalmente se utilizan en el tratamiento de micosis, se han empleado también frente a la leishmaniosis, como son la hamicina (Sarkar *et al*, 1992), la nistatina (Euzeby, 1988) (Micostatín®) y la anfotericina B (Fungizona®).

En particular la anfotericina B es en nuestros días, junto a la pentamidina, el medicamento más utilizado en la terapia de la leishmaniosis visceral cuando fallan los antimoniales (Mishra *et al*, 1992; Murray *et al*, 1993; Pérez *et al*, 1996; Ferrer, 1997b); incluso algunos veterinarios clínicos la consideran de primera elección para el tratamiento de esta enfermedad (Mishra *et al*, 1994; Tesouro *et al*, 1995c).

ANFOTERICINA B

Este hapteno es primariamente conocido como un importante agente para el tratamiento de micosis sistémicas (Berman, 1986a).

Mecanismo de acción:

La capacidad de la anfotericina B para ser activa frente a organismos tan dispares como los hongos y las leishmanias se explica por la similitud existente entre los esteroides de ambos. El esteroide demetilado más frecuente en las membranas celulares de los mamíferos es el colesterol; en los hongos es el ergosterol y en las leishmanias el episterol y el dehidroepisterol (Berman, 1986a). La anfotericina B se une, preferentemente, con el ergosterol de los hongos (Berman, 1986a; Heit *et Riviere*, 1995) y, presumiblemente, con los episteroles de las leishmanias, alterando las membranas celulares de estos microorganismos (Berman, 1986a).

Ensayos *in vitro* han revelado que la anfotericina B es tóxica tanto para promastigotes como para amastigotes de *L. donovani* y de *L. tropica* (Berman *et al*, 1980) y muestra una excelente actividad en cultivos celulares (Peters, 1976) e *in vivo* en ratones (Peters, 1976; Trotter *et al*, 1980). Recientemente, se ha observado una mayor efectividad de la anfotericina B frente a promastigotes que frente a amastigotes de *L. infantum* que, además, es dosis-dependiente (Méndez, 1997).

Posología:

Su administración se realiza en **infusión endovenosa** (diluida en una solución salina fisiológica o de dextrosa al 5%), generalmente, lenta (Bussieras, 1977b; Rodríguez *et al*, 1984; Euzéby, 1988; OMS, 1990; Tesouro *et al*, 1995c; Heit *et Riviere*, 1995) aunque, recientemente, se ha propuesto la aplicación rápida (de 5 a 45 segundos) de anfotericina B por esta misma vía (Lamothe, 1997a).

La dosificación varía de 0.1 a 1 mg/kg y suelen suministrarse dosis gradualmente crecientes (OMS, 1984; Rodríguez *et al*, 1984; Mishra *et al*, 1994), ya que los pacientes parecen ir desarrollando tolerancia a ciertos efectos secundarios a medida que se utiliza el medicamento (Heit *et Riviere*, 1995).

Los **protocolos terapéuticos**, aunque mucho más homogéneos que en el caso de los antimoniales pentavalentes, difieren entre algunos autores. El tratamiento recomendado por la OMS se inicia con 0.1 mg/kg, aumentando diariamente 0.1 mg/kg hasta llegar a una dosis final de 0.5-1 mg/kg. A partir de entonces, se suministra en días alternos hasta aplicar una dosis total de 1-3 g (Rodríguez *et al*, 1984; OMS, 1990; Mishra *et al*, 1992).

Thakur *et al* (1994) proponen la administración diaria de anfotericina B a las mismas dosis hasta un total de 20 mg/kg, ya que este protocolo es igualmente efectivo y bien tolerado y resulta mucho más barato (Thakur *et al*, 1994).

En la práctica veterinaria, algunas de las pautas que se utilizan son:

- Anfotericina B en infusión intravenosa lenta en una solución de dextrosa al 5%, empezando con 0.15 mg/kg en días alternos durante dos meses, seguido de 0.25 mg/kg/48 h durante 1 mes (Buracco *et al*, 1990).

- 0.4-0.5 mg/kg/día como dosis definitiva, iniciando la terapia con 0.1 mg/kg e incrementando la cantidad de anfotericina B en 0.1 mg/kg cada día, aplicando un total de 15 inyecciones. A continuación se suspende la terapia durante dos semanas para luego dar un segundo ciclo de 15 inyecciones bajo las mismas directrices que el primero (Tesouro *et al*, 1995c).

Lamothe (1997), tras un ensayo clínico en leishmaniosis canina natural, recomienda el siguiente protocolo terapéutico: 0.5-0.8 mg/kg, en inyección intravenosa rápida (de 5 a 30 segundos), dos veces por semana, hasta una dosis total de 6 a 16 mg/kg (Lamothe, 1997a).

Efectos colaterales:

La toxicidad de la anfotericina B sería debida, según algunos autores, a la unión de ésta con el colesterol de las células del hospedador (Berman *et al*, 1992).

Los efectos secundarios indeseables asociados al uso de este compuesto incluyen: flebitis localizada, anorexia (que suele ser frecuente dentro de las 24 horas que siguen a la inyección rápida del compuesto) (Lamothe, 1997a), náuseas, vómitos, hipokalemia, anemia, elevación de los niveles séricos de la urea y de la creatinina (OMS, 1984; Berman *et al*, 1992), estomatitis, ictericia y parada cardíaca. Se han descrito otros síntomas de intolerancia, como temblores y fiebre, que pueden aparecer durante la infusión endovenosa. Todas estas manifestaciones pueden ser ligeras y desaparecer al cesar el tratamiento (Thakur *et al*, 1993; Thakur *et al*, 1994; Mishra *et al*, 1994; Pérez *et al*, 1996).

Su toxicidad, especialmente sobre el riñón (Tennant, 1997), hace imprescindible una estrecha **vigilancia de la función renal** (Euzeby, 1988), mediante determinaciones periódicas (1 ó 2 veces por semana) de la urea y creatinina a lo largo de todo el tratamiento, que debe ser suspendido inmediatamente en caso de elevación de las mismas en sangre por encima de los niveles normales (Delgado, 1994; Lamothe, 1997a) pudiéndose reinstaurar la terapia una vez se hayan normalizado estos valores (Thakur *et al*, 1994; Lamothe, 1997a).

Parece que, en los perros, dosis de 1 mg/kg resultan excesivamente tóxicas provocando, con mucha frecuencia, la aparición de cuadros de insuficiencia renal (Delgado, 1994).

Respuesta al tratamiento:

La anfotericina B se ha empleado con bastante éxito en el tratamiento de la leishmaniosis mucocutánea sudamericana (*L. braziliensis*) (Euzeby, 1988), así como en el kala-azar (Bussieras, 1977b), cuando la medicación clásica ha fracasado (Euzeby, 1982).

Murray y col. (1993), en un experimento *in vivo* con ratones eutímicos y atímicos a los que inocula *L. donovani* y, posteriormente, trata con antimoniales pentavalentes, pentamidina y anfotericina B, concluye que, tanto los antimoniales como la pentamidina, necesitan de una buena respuesta celular T por parte del hospedador para la consecución de resultados satisfactorios en la terapia frente a la enfermedad (Murray *et al*, 1993).

Esto se ve apoyado por la observación clínica de pacientes humanos, con leishmaniosis visceral, deficientes en células T (edad muy temprana, inmunosupresión yatrogénica, SIDA, etc.) que no responden adecuadamente a la estiboterapia (Longstaffe *et al*, 1986; Quilici *et al*, 1988; Botet *et al*, 1993; Piarroux *et al*, 1996).

Al contrario, la anfotericina B mostró una potente actividad leishmanicida tanto en los ratones eutímicos como en los atímicos. Dichos resultados sugieren que esta sustancia podría ser de especial utilidad en pacientes deficientes en células T que padezcan leishmaniosis visceral (Murray *et al*, 1993).

Mishra y col. (1992), por su parte, comparan la eficacia de la anfotericina B y la pentamidina, en un ensayo con 120 casos de kala-azar no complicado, parasitológicamente confirmado y con respuesta ineficaz al tratamiento con antimoniales. La pentamidina se aplicó en 20 inyecciones vía IM en días alternos a la dosis de 4 mg/kg; la anfotericina B se administró, en dosis crecientes hasta un máximo de 0.5 mg/kg en infusión endovenosa y un total de 14 inyecciones, también en días alternos.

A las seis semanas los resultados indicaban que un 80% de los pacientes tratados con pentamidina habían conseguido la curación inicial, porcentaje que alcanzaba el 100% con anfotericina B. Tras un período de seis meses, el 77% de los casos sometidos a la terapia con pentamidina y el 98% de los tratados con anfotericina B lograban la curación definitiva; es decir, ésta mostró su superioridad terapéutica con respecto a aquella en el tratamiento del kala-azar que, previamente, no había respondido a la estiboterapia (Mishra *et al*, 1992).

Posteriormente, Mishra y col. (1994) comparando los efectos terapéuticos del estibogluconato sódico (10 mg Sb⁵⁺/12 h durante 40 días) y de la anfotericina B (14 dosis de 0.5 mg/kg/48 h) en pacientes con kala-azar, obtienen con estos dos protocolos un 70% y un 100% de curaciones iniciales respectivamente (Mishra *et al*, 1994).

En otro estudio realizado sobre 300 pacientes con respuesta negativa al estibogluconato sódico y a la pentamidina, la administración de anfotericina B (1 mg/kg/48h, empezando con 0.05 mg/kg y aumentando gradualmente, hasta una total de 20 mg/kg y repitiéndose el tratamiento en caso necesario) resultó en un 99% de curaciones durante un seguimiento de seis meses (Thakur *et al*, 1993). El tratamiento con anfotericina B a las mismas dosis pero en aplicación diaria sería igualmente efectivo y mucho más barato (Thakur *et al*, 1994). La administración de 1 mg/kg/día durante 20 días en pacientes con kala-azar minimizaría las recidivas y prevendría el desarrollo de resistencia a la terapia (Thakur *et al*, 1996b).

Con el empleo de anfotericina B a dosis de 1 mg/kg/48h durante 2 meses, también se ha obtenido una buena respuesta frente a leishmaniosis visceral causada por *L. infantum*, en un caso refractario a otros tratamientos previos consistentes en la administración de varios ciclos de Glucantime® solo y, posteriormente, asociado a alopurinol, seguidos de la administración de pentamidina (Pérez *et al*, 1996).

En el tratamiento de la leishmaniosis canina también se han registrado buenos resultados (Tesouro *et al*, 1995c). Lamothe (1997) consigue la remisión clínica en el 93% de los animales que reciben una dosis total de anfotericina B superior a 6 mg/kg (Lamothe, 1997a). Delgado (1994), por su parte, asegura obtener entre un 80% y un 85% de curaciones, es decir, normalización del proteinograma, descenso del título de anticuerpos por debajo de los valores significativos y análisis parasitológico, por aspiración de médula ósea, negativo (Delgado, 1994).

Algunos clínicos emplean la anfotericina B asociada a distintas dosis de Glucantime® y, aunque parece que esta asociación es bastante eficaz, no existen estudios rigurosos al respecto (Tesouro *et al*, 1995c).

En todo caso, su elevada toxicidad (Rodríguez *et al*, 1984) (que obliga a ajustar muy bien las dosis), la pauta de tratamiento que requiere (tan engorrosa y prolongada) y la necesidad de controlar estrechamente la función renal a lo largo de toda la terapia, hacen que este antibiótico antifúngico se aleje mucho de lo que sería el medicamento ideal contra este proceso (Delgado, 1994; Denerolle, 1996).

OTROS ANTIBIOTICOS

Otros antibióticos que han mostrado actividad frente a *Leishmania spp.* son la tunicamicina, la sinefungina, la rifampicina y los aminoglucósidos (eritromicina, tobramicina) (Iskandar, 1978; Euzeby, 1988; Lawrence *et Robert-Géro*, 1989; Tapia *et al*, 1992). Dentro de este último grupo la aminosidina está adquiriendo, en la actualidad, una especial relevancia.

AMINOSIDINA

La aminosidina (también conocida como paromomicina o monomicina (Neal *et al*, 1995)) es un antibiótico aminoglucósido producido por *Streptomyces rimosus* (Lindsay *et Blagburn*, 1995) que ejerce una buena acción frente a la leishmaniosis cutánea (*L. major*) en aplicación local. Stosiek y col. (1992) utilizando sólo paramomicina tópica en el tratamiento de nódulos cutáneos en un caso de leishmaniosis, consiguen la curación completa de las lesiones en tres meses (Stosiek, 1992).

In vitro ha mostrado actividad frente a varias cepas de *L. donovani* (Neal *et al*, 1995) e *in vivo* (en ratones BALB/c) frente a *L. infantum* (Buffet *et al*, 1996), así como un efecto sinérgico con estibogluconato sódico cuando se utilizan en combinación y administrados por vía subcutánea (Neal *et al*, 1995).

Estudios farmacocinéticos sobre aminosidina y antimonio de N-metil glucamina administrados por vía subcutánea, en perros sanos, muestran que este aminoglucósido potencia sensiblemente la persistencia de niveles altos de antimonio en sangre, lo que sugiere que la dosis de antimonial podría ser reducida y administrada a intervalos más largos de tiempo en el tratamiento de la leishmaniosis. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que los perros enfermos, a menudo, sufren algún tipo de daño renal. Debido a que ambos fármacos se excretan principalmente por riñón, los perros con este tipo de afección deben ser vigilados para un empleo seguro y efectivo de estos medicamentos (Belloli *et al*, 1995).

En el kala-azar humano la combinación de aminosidina (12 mg/kg/día) con estibogluconato sódico (20 mg Sb⁵⁺/kg/día), ambas por vía IM durante 20 días, ha conseguido curaciones (clínica y parasitológica) del 82%, siendo bien tolerada y suponiendo una buena alternativa en los pacientes que no responden satisfactoriamente al tratamiento exclusivamente a base de antimoniales (Thakur *et al*, 1992).

En el perro enfermo (por *L.infantum*) el empleo de aminosidina a diferentes dosis también ha dado buenos resultados. El **esquema terapéutico** más prometedor parece ser el que emplea esta sustancia a dosis de alrededor de 10.5 mg/kg/día, en dos administraciones separadas 12 horas, por vía IM o SC, durante 3 semanas, ya que la eficacia terapéutica parece similar a la obtenida con dosis superiores pero la posibilidad de un efecto nefrotóxico se reduce. La ototoxicidad observada en algunos casos parece independiente de la dosis administrada. Ambos fenómenos son reversibles tras la suspensión del tratamiento (Persechino *et al*, 1994).

Poli y col. (1997) han observado una respuesta clínica y serológica más rápida empleando aminosidina, a dosis similares a las anteriormente citadas, que administrando 150 mg de estibogluconato sódico/kg/día IV, ambos durante un periodo de 4 semanas. En consecuencia, sugieren que este aminoglucósido podría ser una buena alternativa a los antimoniales para el tratamiento de la leishmaniosis canina (Poli *et al*, 1997).

DERIVADOS DEL IMIDAZOL

Los imidazoles son compuestos antifúngicos (algunos de ellos con actividad frente a ciertas bacterias y protozoos) que han sido estudiados, sobre todo, en la terapia de la leishmaniosis cutánea (Euzeby, 1988). Los más conocidos son: el *metronidazol* (Flagyl®), el *secnidazol* (Flagentil®) y el *ketoconazol* (Panfungol®) (Euzeby, 1982).

Al igual que la anfotericina B, los imidazoles tienen más afinidad por los esteroides de los hongos y leishmanias que por los de las células de los mamíferos y actúan inhibiendo su síntesis (Croft, 1988). Favorecen la activación de la fosforilasa que intensifica la glucogenólisis y conduce a una deplección de las reservas glucogénicas y, por tanto, a la muerte del protozoo. Su acción se extiende al metabolismo proteico mediante la formación de complejos con el DNA e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Euzeby, 1982).

Algunos autores emplean el ketoconazol a dosis de 7 mg/kg/día, por vía oral, durante 1 a 3 meses (Villmer *et al*, 1986; D'Ambrosio *et al*, 1987; Euzeby, 1988; Weinrauch *et al*, 1983), mientras que otros prefieren administrar dosis más elevadas: 25 mg/kg/día oral, 3 meses (Bussieras, comunicación oral) (Euzeby, 1988). También se ha empleado a la dosis de 15 mg/kg/12 h, oral durante 21 días (Wasunna *et al*, 1995). Para el metronidazol y el secnidazol las pautas de tratamiento utilizadas son, respectivamente, 10-15 mg/kg/12 h y 30 mg/kg/día, ambos por vía oral durante un período de 15 días (Euzeby, 1982).

En general, los derivados del imidazol son poco tóxicos (Longstaffe *et Guy*, 1986), aunque el ketoconazol ha mostrado una significativa nefrotoxicidad, por lo que su administración está contraindicada en caso de azotemia (D'Ambrosio *et al*, 1987; Euzeby, 1988).

El metronidazol es tolerado por los perros, sin ningún problema, a una dosis de 50 mg/kg/día durante un mes (Bussieras, 1977b) y el secnidazol se ha utilizado experimentalmente en perros a la dosis de 100 mg/kg/día oral 3 meses, sin que se apreciaran signos de intolerancia (Euzeby, 1982).

El ketoconazol ha mostrado su eficacia tanto *in vitro* como en la enfermedad natural, pero no de una manera constante (Euzéby, 1988). En experimentos *in vitro* muestra actividad contra amastigotes de *L.tropica* en macrófagos. En modelos experimentales *in vivo* (con roedores), por el contrario, resulta efectivo frente a la leishmaniosis visceral pero no frente a la cutánea (Croft, 1988). En medicina humana el ketoconazol se ha mostrado efectivo en leishmaniosis cutánea (Vilmer *et al*, 1986; Weinrauch *et al*, 1983; Skoyma-Karez, 1997).

Bussieras (comunicación oral) (Euzéby, 1988) y D'Ambrosio y col. (1987) (D'Anbrozio *et al*, 1987) llegan, asimismo, a resultados muy diferentes en perros con leishmaniosis visceral tratados con ketoconazol: el primero obtiene una buena respuesta, aunque sin curación parasitaria, administrando este fármaco por vía oral durante 2 ó 3 meses a la dosis de 25 mg/kg/día; el segundo, con una dosis de 7 mg/kg/día utilizando la misma vía y duración de tratamiento, consigue la desaparición de los parásitos de la piel, pero señala una importante nefrotoxicidad por parte de este medicamento, contraindicando su uso, como ya se ha mencionado anteriormente, en caso de azotemia.

El metronidazol ha mostrado cierta actividad experimentalmente *in vivo* (Peters *et al*, 1980) y se ha empleado en el tratamiento de la leishmaniosis canina, aunque no existen datos que reflejen su eficacia. De todas formas, dada su baja toxicidad podría ser interesante probarlo incluso en ausencia de documentación adecuada (Longstaffe *et al*, 1986). El secnidazol tiene una vida media más larga y es capaz de mantener niveles más altos de producto activo, lo que podría hacerlo más eficaz (Euzéby, 1982).

Más recientemente se han realizado algunos ensayos clínicos con itraconazol, que tiene la ventaja de presentar una toxicidad mínima y de ser más efectivo contra microorganismos fúngicos que el ketoconazol (Bravo *et al*, 1993). En leishmaniosis cutánea ha mostrado su eficacia a dosis de 4 mg/kg/día durante 6 semanas (Dogra, 1997). Sin embargo, utilizado en un perro con leishmaniosis visceral, no provocó más que una mínima mejoría después de 2 meses y medio de tratamiento (Bravo *et al*, 1993).

ANALOGOS DE LAS PURINAS (PIRAZOLOPIRIMIDINAS)

Los trinucleótidos púricos, como adenosín trifosfato (ATP) y guanín trifosfato (GTP), son necesarios para la formación de ácidos nucleicos y producción de energía (Berman *et al*, 1985a). Como las leishmanias son incapaces de sintetizar el anillo de purina (Croft, 1988; Euzéby, 1988), los nucleótidos púricos de estos parásitos derivan primariamente de la fosforilación de nucleósidos o bases recuperadas de los productos del catabolismo del hospedador (Berman *et al*, 1985a; Euzéby, 1988).

Por otra parte, estos protozoos tienen una enzima (purina-nucleósido fosfotransferasa) que no está presente, o es muy poco activa, en mamíferos; lo cual significa que ciertos análogos de las purinas pueden ser fosforilados por las leishmanias, pero sólo muy ligeramente por las células de los mamíferos (Berman *et al*, 1985a).

Esta particularidad haría posible la modificación de la síntesis de nucleótidos púricos por los parásitos, pero no por el hospedador, de una forma selectiva (Nelson *et al*, 1979a; Berman *et al*, 1985a) y ha dado origen al estudio de la actividad de los análogos de las purinas y ácidos nucleicos frente a estos microorganismos (Euzebly, 1988).

De entre todas las pirazolopirimidinas, por el momento, las más relevantes en la terapéutica de la leishmaniosis son el **alopurinol** (Zyloric®) y la **formicina B**. Esta se emplea, sobre todo, en leishmaniosis cutánea (Rojas *et Avila*, 1987), mientras que el alopurinol se utiliza en leishmaniosis visceral (Kager *et al*, 1981; Chung *et al*, 1985; Looker *et al*, 1986) y será, en consecuencia, al que principalmente nos referiremos en este capítulo.

ALOPURINOL

Mecanismo de acción:

El alopurinol (4-hidroxi-pirazolo(3,4-*d*)pirimidina), análogo estructural de la hipoxantina, se utiliza habitualmente en el tratamiento de la gota humana (Vademecum Internacional, 1997), pues actúa inhibiendo de forma competitiva la xantina-oxidasa, enzima que cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, reduciendo las concentraciones de este último en sangre (Berman, 1985a; Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 1996). También se ha propuesto como parte del tratamiento y prevención de los cálculos de uratos, especialmente frecuentes en dálmatas (Sorenson *et Ling*, 1993).

El alopurinol ha mostrado su efectividad *in vitro* frente a promastigotes (Marr *et Berens*, 1977). Además, su metabolismo parece ser idéntico en las formas intra y extracelulares de *L. donovani* (Nelson *et al*, 1979b; Berens *et al*, 1980). Por otra parte, tanto el alopurinol como el alopurinol ribonucleósido, previenen la transformación de los amastigotes en promastigotes *in vitro* (Nelson *et al*, 1979b). Todo esto sugiere que los datos obtenidos con los promastigotes serían útiles en predecir la respuesta terapéutica de los amastigotes (Berens *et al*, 1980).

Se sabe que, tras ser fosforilado a través de varias reacciones enzimáticas, el alopurinol es incorporado al RNA donde provoca alteraciones estructurales (Nelson *et al*, 1979b; Looker *et al*, 1986). Además, las enzimas que intervienen en estas reacciones muestran una afinidad mayor por el alopurinol y sus mononucleótidos que por sus sustratos naturales (hipoxantina e inosina). Así, los intermediarios formados en la vía inhiben la síntesis de las purinas (Looker *et al*, 1986).

En definitiva, las pirazolopirimidinas frenan el crecimiento de las leishmanias por inhibición de las enzimas que llevan a cabo la interconversión de las purinas (Marr *et Berens*, 1977; Looker *et al*, 1986) (lo que resulta en una disminución en la capacidad de sintetizar ATP), por alteración del metabolismo de las pirimidinas y por mecanismos que incrementan el catabolismo del RNA (con la consiguiente restricción en la síntesis proteica) (Looker *et al*, 1986).

Posología:

Los **protocolos terapéuticos** con alopurinol son algo más homogéneos que con el Glucantime®. Se emplea tanto solo (Liste *et Gascón*, 1995; Vercammen *et De Deken*, 1996) como en asociación con otros fármacos (Tesouro *et al*, 1995c). La gran ventaja de este compuesto reside en su capacidad de ser activo administrado por vía oral, cosa que no ocurre con los medicamentos utilizados clásicamente en el tratamiento de la leishmaniosis.

Las **dosis** utilizadas varían de 5 a 40 mg/kg/día (Ferrer *et al*, 1995; Tesouro *et al*, 1995c; Liste *et Gascón*, 1995; Vercammen *et De Deken*, 1995; Lester *et Kenyon*, 1996; Denerolle, 1996; Ginel, 1997), aunque la mayoría de los autores consultados emplean dosis en torno a 20 mg/kg/día (Kager *et al*, 1981; Chungue *et al*, 1985; Croft, 1988; Crende *et al*, 1992; Aguiló, 1994). Algunos prefieren dividir la dosis total en varias tomas (Chungue *et al*, 1985; Vercammen *et De Deken*, 1995; Denerolle, 1996), mientras que otros la reducen a la mitad a lo largo del tratamiento (Aguiló, 1994).

Normalmente, los tratamientos son de **larga duración** (1-4 meses (Kager *et al*, 1981; Crende *et al*, 1992; Aguiló, 1994; Tesouro *et al*, 1995c; Liste *et Gascón*, 1995; Vercammen *et De Deken*, 1995) o más (Ferrer *et al*, 1995; Denerolle, 1996)) e incluso, en algunos casos, de por vida (Ferrer, 1997b). El hecho de que su administración se realice vía oral permite que la terapia sea más fácilmente aplicada por los propietarios.

Efectos colaterales:

Las pirazolopirimidinas son, en general, **poco tóxicas** (Rojas *et Avila*, 1987; Croft, 1988; Denerolle, 1996; Nelson *et al*, 1979b) y bien toleradas por los mamíferos, puesto que no son metabolizadas por éstos de la misma forma que por las leishmanias (Euzebey, 1982; Nelson *et al*, 1979a). Los efectos indeseables del alopurinol (erupción cutánea, fiebre, leucopenia, hepatitis, etc.) son raros (OMS, 1984; Ferrer, 1997b); algo más frecuente es la aparición de náuseas, vómitos, diarrea y elevación de la AST, la ALT y la fosfatasa alcalina (Compendium of drug therapy, 1991/1992; Ferrer, 1997b).

También se ha descrito, en medicina humana, la presentación de eritema multiforme severo (síndrome de Stevens-Johnson) pero, al igual que el resto de los signos de intolerancia anteriormente citados, remite tras cesar el tratamiento (Gallerano *et Ling*, 1990).

La administración de dosis excesivas de alopurinol puede causar una hiperxantinuria que podría conducir a la formación de cálculos de xantina (Sorenson *et al*, 1993; Bartges *et al*, 1995). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, esta eventualidad ha sido reconocida en muy raras ocasiones durante el tratamiento de la leishmaniosis canina (Crende *et al*, 1992).

Dado que las reacciones adversas severas, raras a dosis de 10 mg/kg/día, podrían ser parcialmente dosis-dependientes, la toxicidad podría ser un factor limitante en caso de una dosificación elevada y prolongada (Kager *et al*, 1981).

Respuesta al tratamiento:

Evidentemente, la baja toxicidad del alopurinol y la forma en que es administrado (vía oral) conceden a este fármaco, como se ha dicho, considerables ventajas sobre los antimonioales.

In vitro, el alopurinol se ha revelado parcialmente activo frente a *L.tropica* (Berman *et Webster*, 1982) mientras que, experimentalmente *in vivo*, ha mostrado buena actividad frente a *L.infantum* y una nula toxicidad (Peters *et al*, 1980).

Algún éxito se ha conseguido en India y Kenia frente a leishmaniosis visceral pero la respuesta ha sido desalentadora contra leishmaniosis cutánea (*L.braziliensis*). Estos pobres resultados podrían ser atribuidos al rápido metabolismo del alopurinol a oxipurinol por la xantina-oxidasa y a su rápida excreción (Croft, 1988).

Krager y col.(1981) administran el fármaco, a dosis entre 15.8 y 24 mg/kg/día durante 4 a 13 semanas, en pacientes con kala-azar con y sin tratamiento previo con estibogluconato sódico. La respuesta a la terapia fue muy irregular, siendo más positiva en los casos previamente tratados con antimonioales. La curación se alcanzó, en muchos casos, cuando se asociaron ambos fármacos (Kager *et al*, 1981). Parece entonces que, al menos a tales dosis, este análogo de las purinas no representa una alternativa al Pentostam® en el tratamiento inicial de la leishmaniosis pero sí en caso de estiborresistencia, aunque en algunas ocasiones sería necesario reintroducir los antimonioales en la terapia para conseguir buenos resultados (Kager *et al*, 1981; Croft, 1988).

Chunge y col. (1985) tratan a 5 pacientes con leishmaniosis visceral y sin respuesta a la estiboterapia, con Pentostam® (20 mg Sb⁵⁺/kg/12-24 h) y alopurinol (20 mg/kg/día, repartidos en tres tomas al día), obteniendo aspirados esplénicos negativos dentro de los 19 días siguientes a la instauración del tratamiento. Esta combinación fue segura y efectiva (Chunge *et al*, 1985).

La eficacia terapéutica del alopurinol en enfermos de SIDA e individuos VIH positivos con leishmaniosis concurrente es contradictoria. En algunos casos se ha obtenido una respuesta satisfactoria, con cultivos de médula ósea negativos, empleando alopurinol a dosis de 20 mg/kg tres veces al día cuando el tratamiento con antimonioales falla (Dellamonica *et al*, 1989). Ribera y col. (1996), sin embargo, ponen de manifiesto el escaso poder profiláctico de este producto (300 mg/8 h) en la presentación de recidivas, en pacientes previamente tratados con antimonioales (850 mg/día, 3 semanas) y en los que se confirmó una curación clínica y/o parasitológica (Ribera *et al*, 1996).

En la leishmaniosis cutánea post-kala-azar, con la administración de alopurinol, a dosis de 20 mg/kg/día durante largos periodos de tiempo (20-24 meses), se han conseguido curaciones clínicas e histopatológicas sin que se observaran efectos secundarios importantes (Ramesh, 1996).

La combinación de alopurinol con antimonioales también parece estar dando buenos resultados frente a la leishmaniosis canina.

Ferrer (1997) lo emplea, asociado a Glucantime® (75 mg de antimonio de meglumine/kg/día durante 1 ó 2 meses), a la dosis de 20 mg/kg/12 h, durante un mínimo de 6 meses. Con esta pauta, las recidivas en los dos años siguientes son inferiores al 50% (Ferrer, 1997a).

Denerolle (1996) compara, en perros enfermos de leishmaniosis, el empleo del antimonial solo (a dosis de 200 mg de antimonio de meglumine/kg/48 h, SC, hasta conseguir títulos negativos o muy bajos) con la administración de Glucantime® (SC a dosis de 100 mg de antimonio de meglumine/kg/día durante 30-60 días) asociado a alopurinol (30 mg/kg/día dividido en tres tomas diarias indefinidamente) en perros enfermos.

Con Glucantime® solo obtuvo la curación clínica en algo más de la mitad de los perros, mientras que la negativización de la serología se conseguía en algo menos de un tercio de los afectados pero fue necesaria la aplicación de un gran número de inyecciones (al menos 100). El Glucantime® asociado a alopurinol aumentó considerablemente la frecuencia de curación clínica (81.5%). Sin embargo, la tasa de negativización fue muy baja (7.4%). Con estos resultados, concluye que las ventajas de esta asociación son evidentes: tratamientos más simples, menos costosos y respuestas clínicas más rápidas. En cambio, la negativización de la serología sería difícil de alcanzar y los fracasos serían todavía importantes (18.5%) (Denerolle, 1996).

Aun así, de una encuesta realizada entre clínicos de Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) se desprende que este tipo de asociación retrasa sensiblemente la aparición de recidivas (Tesouro *et al*, 1995c). Además y en contraposición a los resultados obtenidos en medicina humana (Ribera *et al*, 1996), recientemente se ha sugerido que el alopurinol podría tener un efecto preventivo en la presentación de recidivas empleado a dosis de 20 mg/kg/día, la primera semana de cada mes y tras la administración de una terapia mixta (30 inyecciones de 100 mg de antimonio de meglumine/kg/día vía IV/SC + 30 mg de alopurinol/kg/día durante 3 meses) (Ginel *et al*, 1997).

El alopurinol también se ha empleado conjuntamente con anfotericina B a la dosis de 10 mg/kg/día (Tesouro *et al*, 1995c) aunque, según algunos autores, no parece aportar ningún beneficio al empleo de anfotericina B sola (Delgado, 1994).

Otras asociaciones (alopurinol + Glucantime® + anfotericina B), utilizadas por algunos clínicos, podrían ser eficaces en el tratamiento de la enfermedad pero, de momento, no tenemos disponible ningún estudio riguroso (Tesouro *et al*, 1995c).

En la leishmaniosis visceral humana la combinación de alopurinol (300 mg/día) con fluconazol (200 mg/día) parece haber dado buenos resultados, con la ventaja de que ambos fármacos son muy poco tóxicos y se pueden administrar por vía oral. Sin embargo, la experiencia clínica, por el momento, es muy escasa (Torrús *et al*, 1996).

En leishmaniosis canina el empleo de alopurinol solo (a dosis de 10-15 mg/kg/día durante al menos 1 mes) parece conseguir la remisión clínica y una reducción en el título de anticuerpos, pero no se obtiene la curación completa (Vercammen *et De Deken*, 1995; Liste *et Gascón*, 1995).

Hay que tener en cuenta que el alopurinol tiene propiedades leishmaniostáticas (Marr *et Berens*, 1977; Euzeby, 1988) más que leishmanicidas, por lo que sólo sería plenamente eficaz en asociación con otros fármacos a los que sinergiza (Euzeby, 1988) o, quizás, tendría que prolongarse la medicación durante un largo período de tiempo (Lester *et Kenyon*, 1996), incluso después de una curación parasitológica aparente (Kager *et al*, 1981).

Actualmente, otros análogos de las purinas se encuentran en investigación. Particularmente, la 3'-deoxi-3'-fluorinosina se ha revelado como un potente agente frente a *L.tropica* y *L. donovani* tanto *in vitro* como *in vivo* (Shin *et al*, 1995).

AGENTES TERAPEUTICOS EN INVESTIGACION

Muchos compuestos se encuentran en distintas fases de investigación para el tratamiento de la leishmaniosis pero, las que parecen haber despertado un mayor interés son las **lepidinas (8-aminoquinolinas)**.

Estas sustancias, usadas habitualmente contra la malaria, parecen ejercer una actividad mucho más potente que el Glucantime® frente a leishmaniosis visceral (Hanson *et al*, 1977; Kinnamon, 1980), en particular la 8-(6-dietilaminohexilamino)-6-metoxi-4-metilquinolina, también llamada **WR-6026** (Kinnamon *et al*, 1978; Chapman *et al*, 1979; Peters *et al*, 1980). Esta lepidina se metaboliza en el hígado de la rata en dos compuestos más polares que juegan un importante papel en la actividad frente a la enfermedad (Euzeby, 1988).

La WR-6026 ha mostrado una excelente actividad *in vivo*, frente a leishmaniosis visceral, tanto por vía subcutánea como administrada oralmente (Peters *et al*, 1980).

El mecanismo de acción no es totalmente conocido. Parece que perturba el metabolismo proteico, tras unirse al DNA mitocondrial (kinetoplasto); así, las mitocondrias se alterarían provocando el bloqueo de la cadena respiratoria del parásito (Euzeby, 1982). En hamsters infectados con *L.donovani*, la WR-6026 administrada oralmente se ha mostrado entre 400 y 700 veces más potente que el antimonio de meglumine (Kinnamon *et al*, 1978; Croft, 1988), aunque también sería eficaz por vía IM (Kinnamon *et al*, 1979; Kinnamon, 1980).

En perros (beagles), se ha obtenido una efectividad anti-leishmania 100 veces mayor que con Glucantime®. Por el contrario, experimentos *in vitro* revelan una actividad muy inferior (alrededor de 3 veces mayor que el Glucantime®), lo que sugiere una transformación de esta sustancia en metabolitos particularmente activos, *in vivo* (Berman, 1985a; Croft, 1988).

Aunque se ha comprobado que este fármaco se tolera bien hasta una dosis única de 60 mg, al igual que otras 8-aminoquinolinas, la WR-6026 cataliza la oxidación de la hemoglobina dando lugar a la formación de una moderada cantidad de metahemoglobina reversible en la sangre de los perros (Croft, 1988) y de los animales de experimentación. Asimismo, ha mostrado una cierta actividad hemolítica (Euzeby, 1982).

En el tratamiento de leishmaniosis visceral humana se ha obtenido algún éxito terapéutico con WR6026 oral a la dosis de 0.75-1 mg/kg/día administrada durante dos semanas y mejores resultados se han logrado prolongando el tratamiento hasta un total de cuatro semanas. Todo ello unido a la baja toxicidad asociada al producto (molestias gastrointestinales, dolor de cabeza y metahemoglobinemia), aseguran futuros ensayos con dosis más elevadas y protocolos más largos (Sherwood *et al*, 1994).

La eficacia de otras quinolinas tanto por vía oral como por vía parenteral, frente a la leishmaniosis cutánea y visceral en animales de experimentación, sugiere que la exploración de sus potenciales debe continuarse (Fournet *et al*, 1994).

Existen muchos más compuestos que han sido y siguen siendo objeto de investigación. A continuación repasaremos brevemente algunos de ellos:

Las **alalinamidas** han mostrado actividad frente a amastigotes en macrófagos a una concentración similar al ketoconazol, pero su actividad *in vivo* no ha sido probada (Croft, 1988).

Entre los inhibidores del metabolismo de las poliaminas destaca el **DFMO (D,L-alfa-Difluorometilornitina)**, cuya toxicidad selectiva frente a tripanosomas está bien establecida. La reducción irreversible de la ornitín decarboxilasa y de la síntesis de poliaminas, ejerce un efecto citotóxico sobre las leishmanias (Euzeby, 1988; Fairlamb, 1989). Su actividad anti-leishmania se ha mostrado en roedores: el DFMO al 2% en el agua de bebida es activo frente a *L.donovani* y tiene un efecto sinérgico con el estibogluconato de sodio (Croft, 1988; Keithly *et Fairlamb*, 1989). *In vitro* su efectividad sobre promastigotes ha sido variable entre distintos clones de *L.infantum*. El **MFMO (delta-monofluorometil dehidroornitina)** y, especialmente, el **MFMOme (delta-monofluorometil dehidroornitina metiléster)** se han revelado como buenos inhibidores del crecimiento de amastigotes y de promastigotes de *L.infantum* en cultivos celulares (Méndez, 1997).

La similitud entre la acción del alfa-DMFO y los **retinoides** ha determinado que estos compuestos hayan sido también objeto de investigación (Ortiz *et al*, 1991). Por otro lado, análogos de la **bis(bencil)poliamina**, como **MDL 27,695**, podrían interferir con la función intracelular de las poliaminas naturales. MDL 27,695 se ha revelado muy efectiva administrada por vía oral en ratones BALB/c experimentalmente infectados con *L.donovani* (Baumann *et al*, 1991).

Algunos **antidepresivos**, entre los que destacan la **clorpromacina** (Berman, 1985a; Euzeby, 1988; Kharazmi *et al*, 1989) la **quinacrina** (Berman, 1985a) y la **clomipramina** (Croft, 1988) se encuentran en distintas fases de investigación y necesitan de más estudios para determinar su posible eficacia en el tratamiento de esta enfermedad.

La **hexadecilfosfocolina**, derivado fosfolípido perteneciente al grupo de las **alkilfosfocolinas**, ha manifestado *in vivo* e *in vitro* una efectividad netamente superior al Pentostam®. Además, induce la diferenciación de las líneas celulares leucémicas en células mieloides maduras, y podría poseer una actividad inmunomoduladora, actuando como un coestimulador en el proceso de activación de las células T mediado por la interleuquina 2 (IL-2) (Kuhlencord *et al*, 1992).

El **ácido *trans*-aconítico**, inhibidor de la enzima aconitasa, frena el crecimiento de *L.donovani*. *In vitro*, inhibe la transformación de amastigotes en promastigotes. En leishmaniosis visceral experimental en hamsters ha mostrado su eficacia y su efecto sinérgico con otros compuestos utilizados habitualmente en el tratamiento de la leishmaniosis (antimoniato de meglumine, pentamidina y alopurinol) permitiendo una reducción en las dosis necesarias de estos medicamentos (Kaar *et al*, 1993).

Otras muchas sustancias, a parte de las ya mencionadas, se siguen investigando con la esperanza de encontrar fármacos cada vez más efectivos contra la leishmaniosis, con menos efectos colaterales y con una posología y coste económico que permitan una terapia más fácil y asequible.

INMUNOMODULADORES

Las importantes alteraciones inmunológicas que se producen en el curso de esta zoonosis han conducido al uso de sustancias inmunomoduladoras para el tratamiento de esta enfermedad, por lo general, asociadas a fármacos más específicos frente a las leishmanias.

Disponemos de dos tipos de inmunomoduladores:

* *Inmunosupresores*: cuyo objetivo sería deprimir la inmunidad humoral y reducir la producción de anticuerpos que, no sólo no protegen contra la enfermedad, sino que resultan nocivos para el hospedador por las lesiones tisulares que provocan.

* *Inmunostimulantes*: cuyo objetivo sería estimular la inmunidad celular y la actividad de los macrófagos.

El problema de los inmunomoduladores está en que, a menudo, son incapaces de actuar de forma discriminada sobre el sistema inmunitario, de manera que tanto los inmunosupresores como los inmunostimulantes ejercen sus efectos, como veremos más adelante, sobre la inmunidad celular y humoral simultáneamente.

INMUNOSUPRESORES

Los inmunosupresores sólo **se utilizan ocasionalmente** como parte de la terapia de la leishmaniosis. Dentro de éstos, los corticosteroides (prednisona y prednisolona) son, sin duda, los más ampliamente empleados (Slappendel *et Greene*, 1990; Cairó *et Font*, 1991; Crende *et al*, 1992; Martínez *et Lloret*, 1992). La mayoría de los autores los aplican, asociados a la medicación específica, en los casos con insuficiencia renal (Slappendel *et Greene*, 1990; Cairó *et Font*, 1991; Denerolle, 1993) ante las evidencias que revelan el carácter inmunomediado de las lesiones glomerulares que se desarrollan en el curso de este proceso (Slappendel, 1988; Naskidachvili *et Peroux*, 1988; López *et al*, 1996). El empleo de corticoides estaría igualmente indicado en caso de uveítis, ya que las inflamaciones oculares profundas responden mal al tratamiento específico solo (Roze, 1996).

PREDNISONA/PREDNISOLONA

Mecanismo de acción:

Aunque los corticosteroides se utilizan como agentes inmunosupresores desde hace muchos años, sus mecanismos precisos de acción permanecen poco claros. Actúan a varios niveles provocando diferentes efectos (Tizard, 1996; Ferguson *et* Hoeing, 1995):

- *Efectos sobre la circulación leucocitaria*: provocan una disminución en la cantidad de linfocitos, eosinófilos y basófilos circulantes; el número de neutrófilos, en cambio, aumenta como consecuencia de una disminución en la adherencia a los endotelios vasculares (marginación) y una migración reducida a los tejidos ya que, los corticoides, deprimen la mayoría de las características de la inflamación (inhiben el aumento de la permeabilidad vascular, la vasodilatación y la emigración de los leucocitos desde los capilares y suprimen la quimiotaxis de los neutrófilos, monocitos y basófilos así como la habilidad fagocítica de los neutrófilos).

- *Efectos sobre la inmunidad celular*: deprimen la capacidad de los linfocitos T para producir la mayoría de las citoquinas (la excepción más importante sería la IL-2). Parece que interfieren el reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad de clase II por parte de los linfocitos T y bloquean la producción de linfotoxinas y de los factores quimiotácticos de los monocitos.

- *Efectos sobre la inmunidad humoral*: los efectos sobre la respuesta de anticuerpos pueden ser variables y dependen de la dosis y el tiempo de administración. En general, los linfocitos B tienden a ser resistentes a los corticoides y se necesitan altas dosis para deprimir la síntesis de anticuerpos.

Otros efectos de los corticosteroides incluyen la supresión de la producción de prostanoïdes e IL-1 por los macrófagos, el bloqueo de la proliferación capilar y fibroblástica y el estímulo de la descomposición del colágeno. Pueden, también, deprimir el eje hipófisis-adrenal (Tizard, 1996; Ferguson *et* Hoeing, 1995). Además, aumentan la lipólisis y la gluconeogénesis y disminuyen la síntesis proteica (Ferguson *et* Hoeing, 1995).

Posología:

La posología es igual para la prednisona que para la prednisolona y varía dependiendo del efecto que esperemos obtener de cualquiera de los dos compuestos.

En perros, las dosis anti-inflamatorias van de 0.5 a 1 mg/kg/12-24 h, mientras que para conseguir un efecto inmunosupresor habría que aumentar la dosificación a 2.2-6.6 mg/kg/12-24 h. La administración puede realizarse por vía IV, IM u oral (Davis, 1987; Papich, 1992; Tizard, 1996; Ferguson *et* Hoeing, 1995; Tennant, 1997). Hay que tener en cuenta que dosis consideradas como antiinflamatorias, administradas durante largos periodos de tiempo, pueden tener un efecto inmunosupresor (Arboix, 1994).

En la leishmaniosis canina, las dosis mayoritariamente empleadas suelen ser de 0.5 a 2 mg/kg/día (Bergeaud, 1988; Slappendel *et* Greene, 1990; Bourdoiseau, 1993; Roze *et* Pages, 1994; Denerolle, 1996), durante un periodo de tiempo que va de una semana (Tesouro *et al*, 1995c) a un mes (Roze *et* Pages, 1994).

Con el fin de minimizar el riesgo de una insuficiencia corticoadrenal aguda la corticoterapia no debe interrumpirse bruscamente, sino reduciendo de forma paulatina la dosis y la frecuencia de administración (Compendium of drug therapy, 1991/1992; Tennant, 1997).

Efectos colaterales:

La mayoría de los efectos de los corticoides son **dosis dependientes** (Ferguson *et* Hoeing, 1995) y derivan de sus mecanismos de acción: retrasan la cicatrización y curación de las fracturas, como consecuencia de la inhibición de la proliferación de capilares y fibroblastos y de la estimulación en la descomposición del colágeno; pueden inducir la presentación de un síndrome de Cushing (hiperadrenocorticism) yatrogénico, por supresión del eje hipofisario-adrenal; favorecen la susceptibilidad a infecciones secundarias al bloquear la respuesta inflamatoria y la inmunidad celular (Tizard, 1996).

Otras muchas reacciones adversas se describen en relación con los corticosteroides: desórdenes en el equilibrio electrolítico (que se traducen en retención de fluidos e hipertensión) y alteraciones musculoesqueléticas (debilidad y atrofia muscular, osteoporosis), gastrointestinales (úlceras, pancreatitis, distensión abdominal, esofagitis ulcerativa), dermatológicas (petequias, equimosis, eritema, piel fina), neurológicas (dolores de cabeza, vértigo, convulsiones, aumento de la presión intracraneal), oftalmológicas (cataratas, glaucoma), etc. Se han observado, asimismo, reacciones de hipersensibilidad (urticaria, anafilaxia y otras manifestaciones alérgicas).

En caso de sobredosificación, podemos encontrar síntomas nerviosos, hemorragia gastrointestinal, hiperglucemia, hipertensión y edema (Compendium of drug therapy, 1991/1992).

Respuesta al tratamiento:

Como ya hemos comentado, la mayoría de los autores que emplean la corticoterapia como parte del tratamiento de la leishmaniosis canina, lo hacen en los casos con **insuficiencia renal** asociada a la enfermedad (Slappendel *et* Greene, 1990; Cairó *et* Font, 1991; Denerolle, 1996). En cualquier caso, el pronóstico en los animales con fallo renal, a medio plazo, es bastante malo y las supervivencias por encima de 1 año escasas (Naskidachvili *et* Peroux, 1988). En efecto, Denerolle (1996) obtiene resultados relativamente buenos en animales con insuficiencia renal utilizando alopurinol asociado a prednisolona (1 mg/kg/día) y tratamiento sintomático, pero la mayoría de estos casos no viven más de un año (Denerolle, 1996).

Sin embargo, Cairó y Font (1991) han obtenido algunas supervivencias de más de tres años, en perros leishmaniósicos con insuficiencia renal, combinando el Glucantime® con corticoides a dosis inmunosupresoras. A pesar de todo, recomiendan la eutanasia en los animales que se presentan en tal estado (Cairó *et* Font, 1991).

Por su parte, Bergeaud (1988), partiendo de un trabajo de Benderitter (1985) en el que se lleva a cabo un estudio anatomopatológico de las lesiones renales en perros con leishmaniosis, realiza un ensayo clínico utilizando corticoides a dosis inmunosupresoras asociados a antimoniales pentavalentes (Bergeaud, 1988). En su estudio Benderitter (1985) concluye que:

- la insuficiencia renal en la leishmaniosis se asocia, en todos los casos, a una *glomerulonefritis por depósito de inmunocomplejos previamente formados en la circulación sanguínea*. De hecho, estudios recientes reflejan una predisposición a sufrir daños renales en perros con niveles altos de inmunocomplejos circulantes (López *et al*, 1996)

- la toxicidad del Glucantime®, considerada clásicamente la responsable de las lesiones renales, no parece influir en la glomerulopatía

- los tratamientos inmunosupresores pueden modificar la producción de anticuerpos, desviando la formación de inmunocomplejos de clase I y II (patógenos) hacia inmunocomplejos de clase III (no patógenos)

- es muy probable que los inmunocomplejos se depositen en otros muchos órganos.

Como ya hemos dicho, basándose en estas investigaciones, Bergeaud (1988) lleva a cabo un ensayo clínico sobre 43 perros leishmaniósicos en los que el carácter inmunomediado de las lesiones era altamente probable: *glomerulonefritis, uveítis, poliartritis y manifestaciones cutáneas de la enfermedad*.

Todos los casos constituían formas avanzadas de leishmaniosis (muchos de los cuales no habían respondido a otras terapias) y se trataron con Glucantime® (100-200 mg antimonio de meglumine/kg/48 h vía SC) asociado a prednisolona (1-2 mg/kg/día vía oral) durante un mínimo de 40 días aunque, en algunos casos, se prolongó hasta obtener la desaparición completa de los síntomas. La prednisolona se interrumpió, de manera progresiva, alrededor de 15 días después de finalizada la estiboterapia.

De nueve casos con nefritis, tres murieron antes del año y medio desde el inicio del tratamiento pero seis recuperaron los valores normales de azotemia y creatinina durante 18 meses; ocho de los cuarenta y tres perros se volvieron serológicamente negativos entre los 6 y los 12 meses post-tratamiento. En los animales con síntomas cutáneos crónicos (como úlceras profundas en las almohadillas), que no respondieron a otros tratamientos, se obtuvo la curación clínica.

Treinta y cinco perros presentaron recidiva tras varios meses de alcanzada la curación clínica. Estas recidivas, no obstante, fueron menos severas y remitieron con un nuevo tratamiento. La evolución a largo plazo muestra que, en general, las recidivas son cada vez menos severas y en espacios de tiempo más prolongados. Al contrario, los individuos con uveítis recaían sistemáticamente sin que llegasen a alcanzar la remisión clínica en ningún momento (Bergeaud, 1988).

Otros estudios coinciden con estos resultados, observándose una discordancia entre la evolución de los signos cutáneos y biopatológicos y la evolución de la uveítis, aun cuando se asocia la quimioterapia a inyecciones subconjuntivales de corticoides. Así, la uveítis puede persistir de forma crónica, incluso ante la remisión de los signos cutáneos y un descenso significativo del título de anticuerpos específicos (Roze, 1990). Además, muchas veces las lesiones oculares recidivan sin que se observe una reactivación de la leishmaniosis (proteínograma, estado general, etc.) (Varela, 1992). En estos casos es necesario actuar antes de que se generalicen las sinequias iridianas (Roze, 1990).

Aunque la administración de corticoides a dosis antiinflamatorias o inmunosupresoras puede estar indicada en caso de uveítis (Roze, 1996), el empleo de antiinflamatorios no esteroideos (AINE), particularmente del ácido tolfenámico (Tolfedine®), permitiría reducir (o incluso eliminar) la aplicación de corticoides en tales casos (Roze et Pages, 1994).

Basándose en su experiencia clínica y tras estudios comparativos entre el empleo de Tolfedine® y de corticoides, Roze (1992) propone el siguiente protocolo terapéutico para la uveítis asociado a la medicación específica (Roze, 1992):

- **Tratamiento tópico:** colirio antibiótico asociado a dexametasona 2-4 instilaciones al día (dependiendo de la severidad de la inflamación) indefinidamente + colirio de atropina durante 10 días (lo ideal es obtener una midriasis moderada y no máxima) + inyección conjuntival de metil-prednisolona con la frecuencia que se considere necesaria pero, al menos, cada dos meses.

- **Tratamiento general:** Tolfedine® (4 mg/kg/48 h = 1ml/10 kg/48 h vía SC, durante 6 días y, a continuación, 2 inyecciones/semana durante dos meses; después, se decide si se interrumpe o se reinicia el tratamiento siguiendo las mismas directrices que para el primero) + prednisolona, si es necesario, (a dosis mucho más reducidas que cuando se emplea sola: 0.16 mg/kg/día). Los efectos secundarios con Tolfedine® son muy raros (tan sólo en un caso se observó la aparición de vómitos y diarrea).

En conclusión, hay que tener en cuenta que estos tratamientos serían de interés dentro de las formas graves de la enfermedad, con recidivas frecuentes y falta de respuesta a los tratamientos clásicos, en las que la terapia inmunosupresora se revela de una gran utilidad. Sin embargo, es evidente que la aplicación del tratamiento sin corticoides es necesaria y que éstos parecen contraindicados en las formas menos severas. Sería, por tanto, necesario precisar los criterios que caracterizan las formas en las que esta terapéutica podría ser eficaz y aquellas en las que es innecesaria e incluso nociva (Bergeaud, 1988).

INMUNOESTIMULANTES

En la leishmaniosis canina la inmunidad mediada por células (que sería la efectiva frente al parásito) se ve comprometida por la acción de la propia *Leishmania*. Además y como ya es bien sabido, en los sujetos inmunodeprimidos la enfermedad es más severa y la respuesta terapéutica peor. Parece, por tanto, que la asociación de inmunoestimulantes a la terapia específica podría ser de gran utilidad en el tratamiento de este proceso (Euzebly, 1988).

LEVAMISOL

Isómero levógiro del tetramisol, el levamisol es un antihelmíntico ampliamente empleado, por su amplio espectro de actividad, frente a un gran número de especies (Barta, 1992; Courtney *et Roberson*, 1995). En 1971 se detecta su efecto sobre las respuestas inmunitarias (Renoux *et Renoux*, 1971).

Mecanismo de acción:

Como antiparasitario, ejerce una acción paralizante sobre los nematodos provocando en ellos una contracción muscular sostenida. (Courtney *et Roberson*, 1995; Tennant, 1997).

Además, se sabe que el levamisol modula el sistema inmunitario corrigiendo los desequilibrios inmunológicos: reactiva la inmunidad mediada por células, potenciando la velocidad de diferenciación de los linfocitos T (Tizard, 1996; Courtney *et Roberson*, 1995) y la fagocitosis y destrucción intracelular de los parásitos por los macrófagos y granulocitos (Barta, 1992; Tizard, 1996; Tennant, 1997). También incrementa la respuesta a antígenos y mitógenos y la actividad de los linfocitos efectores (Tizard, 1996; Courtney *et Roberson*, 1995).

El levamisol carece de actividad inmunitaria sobre individuos sanos, siendo su efectividad mayor cuando la **función celular T está deprimida** (Prescott *et Baggot*, 1991; Tizard, 1996). Efectivamente, en ciertos pacientes anérgicos, este fármaco invierte la anergia promoviendo la maduración de los precursores de las células T a linfocitos plenamente activos (Courtney *et Roberson*, 1995). En medicina humana se han visto efectos beneficiosos en algunos pacientes con inmunodeficiencias, procesos inflamatorios e infecciones crónicas y en determinados tumores malignos (melanomas, tumores de mama y carcinomas broncogénicos). Generalmente, esta droga disminuye la frecuencia, duración y severidad de la enfermedad en dichos pacientes (Courtney *et Roberson*, 1995).

En los animales todavía no han sido probados estos efectos (Tennant, 1997). De hecho, el empleo de levamisol ha ofrecido resultados decepcionantes, en perros y gatos, cuando se ha empleado en el tratamiento de piodermas, tumores y dirofilariosis (administrado diariamente o en días alternos a dosis entre 2.2 y 24 mg/kg vía oral). En ensayos clínicos realizados en estas especies también parece haber tenido muy poco o ningún efecto (Barta, 1992) e, incluso, en algunos casos ha potenciado la progresión de las enfermedades infecciosas (Prescott *et Baggot*, 1991).

Posología:

La frecuencia y dosificación del levamisol es muy importante en la consecución de una modulación beneficiosa de la respuesta inmunitaria. Un **tratamiento intermitente** es más efectivo que uno continuo y las dosis que deben administrarse para un efecto inmunoestimulante se encuentran en torno a 1/3-1/4 de las recomendadas para el tratamiento antihelmíntico, teniendo siempre presente que una sobredosificación del medicamento puede conducir a un estado de inmunosupresión y, por tanto, a una exacerbación del proceso (Courtney *et Roberson*, 1995; Tennant, 1997).

En la terapia antihelmíntica el protocolo seguido es 5-12 mg/kg/día vía oral, durante 2-12 días (Davis, 1987; Courtney *et Roberson*, 1995; Tennant, 1997), mientras que como inmunomodulador se utiliza a dosis de 0.5-2 mg/kg, 3 días/semana en administración oral (Buracco *et al*, 1990; Papich, 1992; Courtney *et Roberson*, 1995). Enfermedades crónicas recurrentes podrían requerir la repetición de la pauta anterior para alcanzar la remisión (Courtney *et Roberson*, 1995).

Efectos colaterales:

Los efectos secundarios del levamisol vía oral suelen ser ligeros siguiendo la posología recomendada, pero se intensifican al aumentar la dosis (aunque presenta un amplio margen de seguridad) o al administrarlo parenteralmente, sobre todo, si se aplica en inyección IV.

La intoxicación se asemeja a los síntomas de envenenamiento por organofosforados como salivación, lagrimeo, excitabilidad, agranulocitosis, alteraciones hepáticas, vómitos, diarrea, excitabilidad y otros signos del sistema central (SNC), edema pulmonar y lesiones cutáneas inmunomediadas (Barta, 1992; Courtney *et Roberson*, 1995; Tennant, 1997).

Respuesta al tratamiento:

La respuesta terapéutica depende de la dosis de fármaco, del momento de su administración y de la respuesta inmunitaria del enfermo (Prescott *et Baggot*, 1991). De momento al menos, el levamisol no se utiliza con mucha frecuencia en el tratamiento de la leishmaniosis canina. En todo caso, siempre se emplea como inmunomodulador asociándose a otros medicamentos más específicos frente a esta parasitosis (Crende *et al*, 1992).

Los autores no parecen ponerse de acuerdo en lo que se refiere a su **eficacia** terapéutica. Algunos afirman que su eficiencia es, en perros y gatos, muy escasa o nula (Barta, 1992; Aguiló, 1994); lo cual, unido a los efectos secundarios derivados de su administración, haría desaconsejable su uso en estas especies animales (Barta, 1992).

Otros, en cambio, aseguran obtener una respuesta muy satisfactoria en el tratamiento de la leishmaniosis canina cuando lo asocian a alopurinol. En efecto, Crende y col. (1992) publican un trabajo en el que se describen los efectos terapéuticos de esta combinación medicamentosa. El protocolo de tratamiento que utilizan es:

- *Levamisol*: 2 mg/kg/día oral; en tres ciclos de tres días, interrumpidos por tres días de descanso, en el primer mes de tratamiento. En el segundo mes, los periodos de descanso aumentan a siete días. Durante el tercer y cuarto mes los intervalos entre ciclos se incrementan a diez días.

- *Alopurinol*: 20 y 30 mg/kg/12 h oral (para perros de más y de menos de 30 kg, respectivamente), durante todo el tratamiento.

Estos autores señalan cómo 52 perros leishmaniósicos respondieron satisfactoriamente a la terapia, con desaparición de los síntomas externos, en un plazo máximo de 90 días y normalización del proteinograma a partir del quinto mes. El 42% de los animales presentaba algún grado de insuficiencia renal, que fue tratada antes de iniciarse la terapia oral. Un caso presentó hepatitis yatrogénica que cedió al cesar, temporalmente, el tratamiento, el cual se reinstauró tres semanas más tarde junto con una dieta de apoyo.

En este mismo trabajo, se compara la respuesta clínica y la evolución analítica a este protocolo terapéutico con los resultados obtenidos tras la administración de antimoniales a la dosis de 60-80 mg de antimoniato de meglumine/kg/48 h IM en series de 15 inyecciones, consiguiéndose una clara superioridad con la terapia oral en todas las fases del tratamiento. Frente al uso de antimoniales a dosis de 150-200 mg de antimoniato de meglumine/kg SC, hay una aparente igualdad en la rapidez y amplitud de la respuesta clínica y analítica, aunque los datos indican una mayor persistencia de los logros terapéuticos conseguidos en los individuos sometidos a la terapia oral propuesta (a los 18 meses post-tratamiento no se conocía de la existencia de ninguna recidiva) (Crende *et al*, 1992).

A partir de la publicación del protocolo propuesto por Crende Casanegra y col. (1992), algunos clínicos de pequeños animales lo han utilizado. En principio, la respuesta terapéutica observada parece alentadora, pero la documentación recogida procede de veterinarios con una corta experiencia en el empleo de esta asociación, por lo que los resultados en cuanto a la eficacia del tratamiento y, sobre todo, a la evolución de los animales tratados son poco precisos. Otros, sin embargo, no han obtenido una respuesta tan buena (aunque su experiencia con esta asociación es, igualmente, muy reducida), por lo que consideran que debería esperarse algún tiempo para que puedan confirmarse estos resultados tan favorables (Tesouro *et al*, 1995c).

CITOQUINAS

Las citoquinas son péptidos mensajeros que regulan multitud de actividades celulares del sistema inmunitario (Peschel *et al*, 1994). Controlan a los macrófagos y linfocitos, participando en la reacción inmunomediada por células (Blood *et Sttudert*, 1990), actuando sobre diversos receptores celulares (Tizard, 1996). Incluyen linfoquinas e interleuquinas (Blood *et Sttudert*, 1990) y, en la actualidad, se conoce un gran número de ellas.

El mayor conocimiento de la red de citoquinas y el aumento en la disponibilidad de citoquinas recombinantes suponen implicaciones importantes en las nuevas terapéuticas. Aunque la experiencia clínica con ellas es limitada, algunas entidades clínicas pueden reconocerse como objetivos para la **aplicación de tales péptidos**: 1) se ha visto que interactúan con el crecimiento de las células malignas, por inhibición directa de las células tumorales o induciendo mecanismos de defensa del sistema inmunitario; 2) la defensa del hospedador frente a agentes infecciosos está regulada por la liberación de citoquinas; 3) reguladores negativos de citoquinas proinflamatorias pueden ser beneficiosos en el tratamiento específico de varios desórdenes autoagresivos; 4) regulan la regeneración celular y tisular (Peschel *et al*, 1994).

En el curso de la leishmaniosis la proliferación del parásito parece estar, cuando menos parcialmente, asociada a la falta de activación de las células T, lo que supone una reducción en la producción de interleuquinas y, por tanto, una menor estimulación de los macrófagos. Además, se ha apuntado la necesidad de una buena respuesta celular T por parte del hospedador para la consecución de resultados satisfactorios en la terapia con antimoniales y pentamidina (Murray *et al*, 1993).

Tales aseveraciones se ven apoyadas por la observación clínica de pacientes humanos, con leishmaniosis visceral y deficientes en células T (inmunosupresión yatrogénica, SIDA avanzado, etc.), que no responden adecuadamente a la estiboterapia (Longstaffe *et Guy*, 1986; Quilici *et al*, 1988; Botet *et Portús*, 1993).

Por otra parte, en estudios experimentales *in vivo* se ha demostrado la eficacia de las linfoquinas frente a *L. donovani* (Reed *et al*, 1984). Todo esto hace que las citoquinas estén siendo objeto de numerosos estudios relacionados con la leishmaniosis, *in vitro* e *in vivo*.

Un grupo de interleuquinas ha sido, y sigue siendo, especialmente estudiado por su implicación particularmente importante en los mecanismos de defensa del hospedador: nos referimos a los **interferones** y, más concretamente, al **interferón-gamma (IFN-gamma)** (Squires *et al*, 1993).

Después de fijarse a la membrana celular, los interferones inician una secuencia compleja de procesos intracelulares que pueden provocar la inhibición de la replicación viral dentro de las células infectadas y favorecer actividades inmunomoduladoras (Philip *et Duffus*, 1992; Vademecum internacional, 1997). El IFN-gamma se encarga de controlar la producción de muchas linfoquinas. También aumenta la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y II, guía la diferenciación y proliferación de células linfoides y no linfoides y acelera su maduración funcional (activa a los macrófagos y estimula la actividad citotóxica de los linfocitos) (Philip *et Duffus*, 1992).

Centrándonos en el tratamiento de la leishmaniosis, el IFN-gamma parece jugar un papel especialmente importante en la defensa del organismo frente a *L. donovani*. *In vitro*, esta citoquina derivada de las células T activa directamente a los macrófagos humanos para destruir las leishmanias intracelulares (Squires *et al*, 1993). Además, induce la acumulación de antimoniales pentavalentes dentro de los macrófagos, lo cual explicaría el aumento en la eficacia de la estiboterapia (Pentostam®), tanto *in vitro* como *in vivo* (Haidaris *et Bonventre*, 1983; Murray *et al*, 1988; Squires *et al*, 1993).

En pacientes humanos con leishmaniosis visceral, Squires y col. (1993) realizan un ensayo clínico comparado utilizando la terapia convencional (Pentostam®: 20 Sb⁵⁺ mg/kg/día) en 14 casos e inmunoquimioterapia (Pentostam® diario asociado a IFN-gamma recombinante humano: 100 mcg/m²/48 h) en 10 enfermos. El IFN-gamma fue bien tolerado y todos los pacientes respondieron a ambos tratamientos, clínica y parasitológicamente, aunque la respuesta fue más rápida en los individuos con inmunoquimioterapia (Squires *et al*, 1993). Aun así, no hay que olvidar que el IFN-gamma puede dar lugar a efectos secundarios como fiebre, cefaleas, escalofríos, mialgias, fatiga, inapetencia y malestar general (Tizard, 1996; Vademecum internacional, 1997). También se han descrito, en algunos pacientes, náuseas, vómitos, artralgias y reacciones de hipersensibilidad (Vademecum internacional, 1997).

Sundar y col. (1994), han obtenido también una buena respuesta terapéutica con esta asociación en pacientes refractarios al empleo de tratamientos convencionales (estibogluconato sódico, pentamidina o anfotericina B). El único efecto secundario apreciable fue la presencia de fiebre persistente (a pesar del uso de antipiréticos) que remitió al cesar la terapia (Sundar *et al*, 1994).

En países de la cuenca mediterránea los resultados terapéuticos con IFN-gamma asociado a antimoniales en la leishmaniosis visceral, han sido irregulares. Tras fracasar empleando 2 ciclos de antimonio de meglumine (60 mg/kg/día, 15 días), Kaplanski y col. (1996) obtienen una mejoría clínica y biopatológica muy importante, durante varios meses, en un paciente con SIDA cuando asocian este mismo protocolo con IFN-gamma (100 mcg/día, 15 días, luego 3 veces por semana durante 1 mes SC) pero no consiguen la curación completa (Kaplanski *et al*, 1996).

Pérez y col. (1996) tratan a un niño de 24 meses, que previamente había recibido antimoniales, alopurinol y pentamidina, con Glucantime® (100 mg de antimonio de meglumine/kg/día, IV, 45 días) asociado a IFN-gamma (2 millones U/m²/día, SC, 45 días); aunque al finalizar el tratamiento presentaba un buen estado general, al cabo de un mes presentó una recidiva (Pérez *et al*, 1996).

Estudios *in vivo* con ratones experimentalmente infectados con *L.infantum* reflejan que el efecto del tratamiento con IFN-gamma recombinante es mejor en fases iniciales de la infección. El reducido efecto en fases más avanzadas podría deberse a cambios en las poblaciones de macrófagos que conducirían a un aumento de macrófagos inmaduros que mostrarían mejor capacidad hospedadora y peores propiedades efectoras que las células residentes predominantes al principio de la infección (Kiderlen *et al*, 1989).

La creciente experiencia en el uso de este inmunoestimulante en medicina humana, unido a la menor capacidad de las células T para secretar IFN-gamma y a las limitaciones de los tratamientos con antimoniales, proporcionan una base racional para probar el IFN-gamma en pacientes humanos con leishmaniosis visceral. Sin embargo, la indicación del uso clínico de los interferones en la especie canina requiere, todavía, del desarrollo de más estudios experimentales (Barta, 1992).

Recientemente se ha clonado y expresado el gen del IFN-gamma canino (Pinelli *et al*, 1997) pero, por el momento, carecemos de interferones de origen canino comercializados en el mercado (Kruth, 1995). Aunque se ha visto, *in vitro* e *in vivo*, que el interferón-alfa (IFN-alfa) presenta una cierta reactividad cruzada entre especies (Barta, 1992; Vademecum internacional, 1997) y, a pesar de que las citoquinas de diferentes especies tienden a tener estructuras similares, una citoquina concreta de una especie determinada podría inducir la formación de anticuerpos frente a ella cuando se administra a otra especie, lo que limita el uso potencial de algunas citoquinas recombinantes humanas en el perro (Kruth, 1995). Además, la aplicación *in vivo* de citoquinas de otras especies ha producido, generalmente, resultados desalentadores (Barta, 1992; Kruth, 1995).

Otras actividades de los linfocitos T y de las citoquinas que éstos producen estarían, asimismo, implicadas en una mejor respuesta al tratamiento con antimoniales (Murray *et al*, 1991; Murray *et al*, 1995). La IL-2 ha mostrado, *in vitro*, un efecto sinérgico con los antimoniales (Pentostam®) frente a amastigotes de *L. donovani*, particularmente cuando se aplica la inmunoterapia en la fase no proliferativa seguida de la estiboterapia en la fase proliferativa de los parásitos (Eslami *et al*, 1996). El principal problema reside en la considerable toxicidad de este compuesto que puede causar efectos secundarios severos incluyendo diarrea y fiebre (Tizard, 1996).

Parece que las citoquinas resultan muy prometedoras no sólo como inmunoterápicos sino también como coadyuvantes de vacunas, pero será necesaria la producción de citoquinas recombinantes específicas de especie. En cualquier caso, la vía de administración, en general parenteral, y su coste de producción limitan mucho el uso de estas prometedoras sustancias (Barta, 1992).

OTROS INMUNOESTIMULANTES

Actualmente, se investiga la actividad inmunoestimulante de otras muchas sustancias y productos. Algunos autores han empleado bacterias, o componentes de las mismas, como estimulantes indirectos de los macrófagos (Haidaris *et Bonventre*, 1983). El *Mycobacterium bovis* (BCG) (Smrkovski *et Larson*, 1977) y el *Corynebacterium parvum*, producen un estímulo generalizado de los linfocitos T y B, de la fagocitosis y de la resistencia a la infección. (Tizard, 1996; Haidaris *et Bonventre*, 1983) En estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha visto que las cantidades de antimoniales (Pentostam®) necesarias para inhibir la infección macrofágica por *L. donovani* decrecen considerablemente para los macrófagos activados con una suspensión fijada de estas bacterias respecto a los no activados. Por el contrario, parece que esta activación macrofágica no estimula la capacidad leishmanicida de los macrófagos cultivados en presencia de anfotericina B (Haidaris *et Bonventre*, 1983).

El fraccionamiento de *Mycobacterium bovis* ha dado como resultado el aislamiento de varios constituyentes activos. Uno de ellos, el **Muramil dipeptido** (MDP), estimula la producción de anticuerpos, la activación policlonal de linfocitos y la actividad de los macrófagos, (Tizard, 1996) y su empleo como inmunoestimulante podría ser interesante en la terapia de la leishmaniosis canina (Euzeby, 1988). Otras bacterias (o productos de las mismas), derivados fúngicos, vitaminas (vitamina E), etc., son, asimismo, capaces de estimular el sistema inmunitario (Tizard, 1996).

La utilización de **antígenos derivados del parásito** también parece interesante para la consecución del éxito terapéutico. Así lo prueba un ensayo en 24 perros afectados de leishmaniosis, en los que se comparó el efecto de la quimioterapia sola (300 mg de antimonio de N-metil glucamina/48h, vía IM durante 40 días), con la inmunoterapia sola (Fracción 2 antigénica parcialmente purificada, derivada de promastigotes de *L. infantum* utilizando SDS-PAGE = LiF2, 94-67 kDa, 50 mcg, IM, en 3 administraciones a intervalos de 7 días) y con la combinación de la quimio e inmunoterapia (iniciándose ésta última 15 días después de terminar con la quimioterapia).

La respuesta al tratamiento se comprobó a los 3 y 6 meses de iniciarse la terapia. La ausencia de parásitos en las punciones medulares era confirmada por cultivo antes de considerar al animal parasitológicamente curado. Las curaciones parasitológicas con la quimioterapia sola y con la inmunoterapia sola fueron 37,5% y 25% respectivamente, mientras que con la combinación de ambas fue del 100%. La alta eficacia de esta asociación sería posible porque, tras la reducción en la carga parasitaria inducida por la droga, los linfocitos T sensibilizados se estimularían por antígenos mitogénicos específicos, con la consiguiente producción de linfoquinas inductoras de la activación de macrófagos que eliminarían los parásitos residuales en el perro (Neogy *et al*, 1994), como así lo sugieren otros estudios *in vivo* realizados en ratones experimentalmente infectados con *L.majoi* (Nabors *et Farrel*, 1996).

Resumiendo, las terapias inmunoestimulantes en la práctica de pequeños animales están en una etapa muy temprana de desarrollo (Kruth, 1995) y su uso clínico en el tratamiento de la leishmaniosis ha sido, en muchos casos, menos exitoso de lo que auguraban los experimentos *in vitro*.

VECTORES DE MEDICAMENTOS

Las células del sistema mononuclear fagocitario (SMF) del bazo y del hígado son las encargadas de retirar primariamente las partículas y vesículas portadoras de medicamentos de la circulación general, inmediatamente después de su administración parenteral (Croft, 1988; Berman *et al*, 1992).

Teniendo en cuenta que *Leishmania* parasita las células del SMF y que las drogas encapsuladas en portadores serían fagocitadas por estas células, los fármacos ejercerían su efecto directamente en el lugar donde se encuentran los protozoos siendo, por el contrario, secuestrados de los demás órganos, incluidos aquellos para los que estos medicamentos fueran normalmente tóxicos. De esta forma, aumentaría la eficacia terapéutica y disminuiría la toxicidad del fármaco (Euzebey, 1988; Croft, 1988; Berman, 1985a). A pesar de estas ventajas existen algunos problemas técnicos con los vectores de medicamentos que han de ser superados:

- el fármaco debe introducirse dentro los mismos y permanecer allí sin salir de su interior hasta ser fagocitados.
- tienen que fundirse con el fagolisosoma que contiene la leishmania o ser digerido por el macrófago para que el medicamento pueda ejercer su efecto.
- han de ser lo suficientemente pequeños como para atravesar las arteriolas y alcanzar las zonas inflamadas.
- no deben ser tóxicos para los hospedadores.

También hay que tener presente que los vectores serían fagocitados por los macrófagos viscerales, pero no por las células de la piel, lo que constituye un problema en la enfermedad cutánea (Berman, 1985a).

LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas sintéticas, generalmente menores de 3 micras de diámetro, constituidas por anillos concéntricos de fosfolípidos de cadena larga altamente saturados (dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol (Alving *et al*, 1978b) y dicetil fosfato) (Alving *et al*, 1980; Euzeby, 1988; Croft, 1988) separados por fases acuosas (Weldon *et al*, 1983; Alving *et al*, 1978a). También existen liposomas integrados por fosfolípidos insaturados (lecitina de huevo), pero resultan menos efectivos frente a *Leishmania* que los que contienen fosfolípidos saturados (dipalmitoilfosfatidilcolina) en su composición (Weldon *et al*, 1983).

Estos vectores adquieren forma espontáneamente cuando los lípidos se dispersan en un medio acuoso (Berman, 1985a). Los fármacos en este medio se incorporan, por lo menos parcialmente, a las fases acuosas de los liposomas; los compuestos que presenten alguna capacidad de solubilizarse en lípidos pueden, también, entrar en las fases lipídicas (Euzeby, 1982; Berman, 1985a).

El almacenamiento no parece ser un problema: a temperatura ambiente (de 10°C a 45°C) no se aprecian filtraciones de la droga durante 2 años. La congelación provoca la ruptura de las vesículas que también son inestables a 100°C (Steck, 1980).

Su **administración es siempre parenteral** (fundamentalmente endovenosa) (Euzeby, 1988), ya que por vía oral no sólo no son efectivos (Berman, 1985a) sino que, además, causan una aparente exacerbación del proceso como resultado de una supresión negativa del parásito. Las vías intraperitoneal e intramuscular, aunque menos usadas que la endovenosa, se han revelado igualmente efectivas. Al contrario, la inyección subcutánea resulta completamente ineficaz (Alving *et al*, 1980).

Una vez en el organismo, los liposomas, se dirigen **directamente a las células del SMF** del hígado y del bazo (Berman, 1985a), penetran en los macrófagos y se funden con los fagolisosomas, en cuyo interior se encuentran las leishmanias; si están cargados con un medicamento, éste ejerce su efecto directamente sobre los protozoos. Se conseguiría, así, una actividad terapéutica superior a la que proporcionan las drogas libres y, por tanto, sería posible reducir las dosis del fármaco y, en consecuencia, los riesgos de intoxicación (Alving *et al*, 1978b; Steck, 1980; Euzeby, 1988).

Los primeros ensayos fueron realizados, experimentalmente en roedores, a finales de la década de los setenta utilizando liposomas cargados con estibogluconato sódico y antimonioato de N-metil glucamina, obteniéndose una eficacia entre 300 y 700 veces superior a la de los antimoniales libres (Alving *et al*, 1978a; Alving *et al*, 1978b; Steck, 1980).

Estudios posteriores confirman estos resultados y, así, en hamsters infectados con *L. donovani*, Alving y col. (1980) concluyen que: 1) el antimonioato de N-metil glucamina encapsulado en liposomas, tenía una efectividad más de 200 veces superior al compuesto solo; 2) la estimulación de la actividad frente al parásito era debida, exclusivamente, a la droga encapsulada; 3) el Glucantime® encapsulado tenía efectos profilácticos y era efectivo administrado 8 días antes de la infección (cosa que no ocurre con la administración del fármaco libre) y 4) los liposomas vacíos, lejos de tener algún efecto terapéutico, aumentaban la mortalidad de los hamsters (Alving *et al*, 1980).

En perros infectados experimentalmente se reproducen los resultados obtenidos con roedores, con una eficacia del Glucantime® encapsulado más de 700 veces mayor que sin encapsular. En ningún caso se observaron signos de intoxicación (Chapman *et al*, 1984).

La formulación liposomal facilitaría la distribución del medicamento, permitiendo que éste fuera parcialmente retenido y dificultando su liberación al torrente circulatorio para su posterior eliminación (Valladares *et al*, 1997). Aunque el tratamiento con liposomas cargados con antimoniales parece efectivo, la desaparición de los síntomas no siempre indica una regresión de la enfermedad (Riera *et al*, 1997) y una completa supresión de los parásitos (Chapman *et al*, 1984).

A pesar de los excelentes resultados logrados experimentalmente con los liposomas tanto en roedores como en perros, en la infección natural la efectividad de los antimoniales encapsulados es mucho más controvertida. Aguiló (comunicación oral, 1994) indica que, en su experiencia, con la administración de Glucantime® encapsulado en liposomas los perros enfermos mejoran más rápidamente pero las recidivas se producen en un espacio de tiempo muy similar a cuando se emplea el fármaco libre (Aguiló, 1994). Por su parte, Slappendel y Greene (1990) obtienen resultados decepcionantes en la enfermedad espontánea (Slappendel *et al*, 1990).

La anfotericina B encapsulada en liposomas ha probado su efectividad en roedores y monos, frente a *L. donovani*, con una reducción de 2 a 4 veces en la toxicidad de la droga, lo que ha permitido usar dosis mayores del medicamento (Berman *et al*, 1986). Una eficacia similar se ha descrito frente a *L. infantum*, en ratones experimentalmente infectados (Gagneux *et al*, 1996).

En medicina humana, se han obtenido resultados alentadores con AmBisome® (anfotericina B encapsulada en liposomas compuestos por fosfatidilcolina, colesterol y distearoilfosfatidilglicerol) (Berman *et al*, 1992) en casos de leishmaniosis visceral complicada (Seaman *et al*, 1995) e, incluso, curaciones en pacientes que no respondieron a otros tratamientos específicos (Croft *et al*, 1991). Aunque muchas veces no se alcanza una curación completa de la enfermedad en individuos VIH positivos (McBride *et al*, 1994), Torre-Cisneros y col. (1993) han conseguido la remisión clínica acompañada de cultivos medulares negativos en dos pacientes VIH positivos con leishmaniosis visceral resistente a la estiboterapia (Torre *et al*, 1993). Davidson y col. (1994) también han logrado buenos resultados en pacientes inmunodeprimidos (por SIDA, neoplasia o quimioterapia) con leishmaniosis (*L. infantum*) empleando AmBisome® a dosis de 1.37-1.85 mg/kg/día durante 21 días, pero las recidivas dentro de los dos años siguientes fueron la norma (Davidson *et al*, 1994).

Posteriormente, Davidson y col. (1996) observan una excelente respuesta en pacientes inmunocompetentes con leishmaniosis visceral (*L. infantum*) y recomiendan una dosis total de AmBisome® mayor o igual a 20 mg/kg, administrada en 5 ó más dosis de 3-4 mg/kg durante, al menos, 10 días (Davidson *et al*, 1996). Similares son los resultados descritos, por otros autores, en pacientes pediátricos (Catania *et al*, 1997), incluso ante una respuesta nula a la estiboterapia y una activación deficiente de la inmunidad celular (Piarroux *et al*, 1996).

Thakur y col. (1996), por su parte, consiguen la curación clínica (sin que en ningún caso se apreciara recidiva 12 meses después) de todos sus pacientes (n=30) independientemente de que recibieran una dosis total de AmBisome® de 6, 10 ó 14 mg/kg administrada en dosis de 2 mg/kg/día (Thakur *et al*, 1996a).

Los efectos secundarios al tratamiento con AmBisome® son mínimos (Thakur *et al*, 1996a; Davidson *et al*, 1996) (elevación de la urea y fosfatasa alcalina), transitorios y no se requiere la interrupción de la terapia (Davidson *et al*, 1994).

A parte de la anfotericina B encapsulada en liposomas, existen otras dos preparaciones de esta droga asociada a lípidos: anfotericina B acomplejada con dimiristoilfosfatidilcolina y dimiristoilfosfatidilglicerol (ABLC) y anfotericina B dispersa en colesterol (ABCD: Amphocil®). Berman y col. (1992) demuestran que el Amphocil® es 15 veces (en hamsters ligeramente infectados) y 4 veces (en hamsters infectados con un elevado número de leishmanias) más activo que la anfotericina B libre (Berman *et al*, 1992). Sundar y col. (1997) afirman que la administración de ABLC (1-3 mg/kg/día hasta una dosis total de 5-10 mg/kg) es efectiva en pacientes con kala-azar refractario al tratamiento antimonial (Sundar *et al*, 1997).

La pentamidina encapsulada ha sido, igualmente, objeto de estudios experimentales con resultados comparables a los obtenidos con los otros compuestos (Euzebly, 1982). También las lepidinas se han mostrado más efectivas cuando van encapsuladas en liposomas. Alving y col. (1980) pusieron en evidencia, en hamsters experimentalmente infectados con *L. donovani*, que la WR-6026 encapsulada, era entre 700 y 1800 veces más efectiva que el Glucantime® libre (Alving, 1980), de forma análoga a los hallazgos de Steck (1980) (Steck, 1980).

Se han realizado, incluso, ensayos *in vivo* con inmunoterápicos incluidos en liposomas. Reed y col. (1984) llevaron a cabo un estudio en ratones infectados experimentalmente con *L. donovani chagasi* y posteriormente tratados con sobrenadantes esplénicos ricos en linfoquinas, encapsulados en liposomas y libres, y estimulados y no estimulados con concanavalina A (estimulador de las células T (Barta, 1992)). Sólomente los ratones tratados con los sobrenadantes estimulados encapsulados en liposomas presentaron una reducción significativa en el número de parásitos en el hígado, demostrando que la efectividad *in vivo* de las linfoquinas frente a la infección dependía de que éstas se encontraran encapsuladas en los liposomas (Reed *et al*, 1984).

La administración de interferón- γ recombinante y de muramitripéptido (MTP-PE) encapsulados han mostrado una mayor eficacia en la reducción de parásitos esplénicos que la administración de estas sustancias libres a dosis equivalentes. El hecho de que estas vesículas multilamelares se dirijan al hígado y bazo las hacen particularmente apropiadas para la distribución de sustancias activadoras de macrófagos usadas para el tratamiento de la leishmaniosis visceral (Hockertz *et al*, 1991).

Las **desventajas de los liposomas** serían: que su administración ha de efectuarse por vía parenteral, que podrían tener cierta toxicidad y que, teóricamente, las infecciones cutáneas serían menos sensibles a la terapia con estos vectores (Berman, 1985a). Además, el coste de tales tratamientos resulta prohibitivo, al menos, en el ejercicio de la veterinaria clínica (Delgado, 1994 ; Denerolle, 1996).

No hay que olvidar que, en muchos casos, sólo existen estudios experimentales y que, en la infección natural canina, no hay datos rigurosos disponibles sobre la efectividad de los liposomas (Ferrer, 1992).

OTROS VECTORES DE MEDICAMENTOS

Aparte de los liposomas, se ha experimentado la acción de **hematíes** cargados con medicamentos leishmanicidas y recubiertos por inmunoglobulina G (IgG) para facilitar su fagocitosis por los macrófagos. Las enzimas de los glóbulos rojos podrían reaccionar con los fármacos atrapándolos dentro de su membrana en mayor grado del que lo harían con una membrana compuesta sólo por lípidos (Berman *et al*, 1985c). Además, los hematíes no son tóxicos y podrían, por tanto, ser útiles como vectores (Berman, 1985a).

Berman y col. (1986) han realizado ensayos *in vivo* en hamsters infectados con *L.donovani*. Utilizando pentamidina en hematíes envueltos con IgG a dosis de 2.5 mg/kg, eliminan la casi totalidad de las leishmanias del hígado y observan una actividad 200 veces superior al estibogluconato sódico libre (Berman *et al*, 1986b).

Los **niosomas** son vesículas constituidas por agentes tensoactivos no iónicos, lo que los diferencia de los liposomas (Euzéby, 1988) aunque, aparentemente, no hay diferencias entre ellos en relación con su capacidad para transportar los antimoniales al hígado. Por tanto, parece que la elección de uno u otro sistema de transporte debería basarse en consideraciones como ausencia de toxicidad, coste y estabilidad y no en su eficacia como portadores. Con respecto a esto, los niosomas podrían resultar más ventajosos (Hunter *et al*, 1988). El empleo de este tipo de formulaciones vesiculares surfactantes no iónicas cargadas con antimoniales ha dado buenos resultados *in vivo* (Carter *et al*, 1997; Mullen *et al*, 1997).

En vista de la aparente incapacidad de las vesículas multilamelares de gran tamaño para llegar a la médula ósea, el empleo de vesículas de menor tamaño (liposomas o niosomas sonificados) resolvería este problema. Esto se pone de manifiesto en un ensayo realizado en ratones BALB/c experimentalmente infectados con *L.donovani*, en el que es posible alcanzar concentraciones leishmanicidas de estibogluconato en el hígado, bazo y médula ósea con pequeñas dosis múltiples utilizando pequeñas vesículas cargadas con la droga. Por el contrario, con el medicamento incluido en vesículas grandes se consigue un efecto de supresión parasitaria significativa en hígado y bazo, pero no en médula ósea (Carter *et al*, 1989).

El empleo de **macromoléculas** (polímeros glicosilados) como vectores de medicamentos también resulta de gran interés. Así, al menos, lo demuestran estudios *in vitro* con macrófagos infectados con *L.donovani*, en los que se emplea poli-L-lisina glicosilada como portador dirigido al receptor manosa-fucosa del macrófago por medio de residuos manosil. Estos polímeros manosilados tienen la ventaja de ser muy solubles, fáciles de preparar, biodegradables, no tóxicos y apenas inmunogénicos incluso a dosis altas. Además, se revelan como un buen sistema de transporte de agentes para los macrófagos infectados con leishmanias y podría ser utilizado *in vivo* para aumentar la biodisponibilidad y/o reducir la toxicidad de los fármacos leishmanicidas (Negre *et al*, 1992).

Las **nanopartículas**, partículas coloidales sólidas de 1 a 1000 nm, son materiales macromoleculares en los que el principio activo es disuelto, atrapado, encapsulado y/o adsorbido o agregado. Los materiales más adecuados para nanopartículas son butil e isobutilcianoacrilato, albúmina, gelatina o ácido poliláctico. Los métodos de producción son relativamente sencillos lo cual, unido al hecho de que pueden ser fácilmente almacenados durante periodos prolongados, hace que las nanopartículas ofrezcan ventajas sobre los liposomas. Al igual que éstos, las nanopartículas son captadas eficientemente por las células fagocíticas y muestran una fuerte tendencia a acumularse en los lisosomas. La unión de medicamentos a nanopartículas conduce a un incremento de su acumulación en el hígado y bazo y, consecuentemente, a un aumento en la eficacia terapéutica. Por ejemplo, el estibogluconato sódico aumenta, experimentalmente, su eficacia en 100 veces con respecto a la droga libre (Kreuter, 1991).

En definitiva, esta forma peculiar de administrar los fármacos leishmanicidas, a través de vectores, merece ser investigada a fondo, ya que permitiría reducir las dosis, aumentar la efectividad y disminuir los riesgos de toxicidad inherentes a los medicamentos. Además, éstos se dirigirían selectivamente a los lugares donde se encuentran las leishmanias, pudiendo disminuir la importancia de las recidivas (Euzeby, 1988).

TRATAMIENTOS DE APOYO

Al margen de los fármacos leishmanicidas o leishmanioestáticos y de las sustancias que actúan sobre el sistema inmunitario, a menudo y en combinación con los tratamientos específicos, se emplea otra medicación cuyo fin es paliar algunos síntomas que pueden aparecer secundariamente o asociados a la leishmaniosis (Tesouro *et al*, 1995c).

Dentro de esta terapia de apoyo destacan: los antibióticos de amplio espectro (en caso de piodermas secundarios) (Martínez *et Lloret*, 1992), la fluidoterapia (cuando el estado de hidratación del animal así lo requiere) (Slappendel *et Greene*, 1990; Martínez *et Lloret*, 1992), los antiinflamatorios (Buracco *et Grazi*, 1990), los reconstituyentes generales (aminoácidos, proteínas, vitaminas) (Euzeby, 1982), las dietas hipoproteicas (en caso de elevación de la urea y la creatinina en sangre) (Roze *et Pages*, 1994) y las transfusiones de sangre o plasma en pacientes con anemia o caquexia severas (Vitoria, 1984).

El desarrollo de un fallo renal es, sin duda, la complicación más grave con la que puede encontrarse el clínico en el curso de esta enfermedad (Kontos *et Koutinas*, 1993) y puede aparecer, a los pocos meses o tras varios años de detectarse los primeros síntomas (Naskidachvili *et Peroux*, 1988). Las **manifestaciones de uremia** pueden ser polisistémicas (Ross, 1992; Polzin *et al*, 1995):

- **signos inespecíficos**: depresión, anorexia, pérdida de peso, poliuria/polidipsia, hipotermia,

- **signos digestivos**: estomatitis, ulceración oral, vómitos, diarrea

- **alteraciones hemáticas:** anemia, tendencia a las hemorragias (debido a disfunción plaquetaria)

- **síntomas musculoesqueléticos:** osteodistrofia (con desmineralización ósea, particularmente en animales que no han alcanzado la madurez)

- **alteraciones cardiovasculares:** la hipertensión es una de las complicaciones más frecuentes de la insuficiencia renal crónica pero su causa no ha sido, todavía, bien precisada. Puede conducir a diátesis hemorrágica y trastornos visuales o ceguera debido a hemorragias o desprendimiento de retina

- **alteraciones del sistema inmunitario:** supresión de la inmunidad humoral y, sobre todo, de la celular, con un incremento en la susceptibilidad a la infección

- **síntomas respiratorios:** taquipnea (secundaria a anemia o acidosis) y bronconeumonía (como resultado de una inmunodeficiencia)

- **signos neurológicos:** debilidad (secundaria a una neuropatía periférica), apatía, letargia (como consecuencia de una encefalopatía urémica). A medida que la uremia se hace más severa, encontramos síntomas como anomalías en el modo de andar, temblores, convulsiones y coma, que pueden desarrollarse de forma aguda.

Independientemente de la causa que lo produzca, la **fluidoterapia** está indicada en los animales que presentan fallo renal con signos de uremia (Schaer, 1989; Rubin, 1995).

El primer objetivo durante una uremia intensa es corregir las alteraciones internas del enfermo. Idealmente, esto permitiría al paciente vivir lo suficiente para que se produjera la reparación del daño renal agudo y la hipertrofia de las nefronas que permanecen viables, ya que las lesiones renales existentes no pueden someterse a una terapia directa (Chew, 1992).

La fluidoterapia ayuda a corregir el déficit de líquido (deshidratación) o el exceso (hiperhidrosis, en animales oligúricos) y las anomalías en el equilibrio electrolítico y ácido-base; inicia o aumenta la diuresis para mejorar la función renal y estimula la excreción de los productos metabólicos de desecho y las toxinas urémicas; restablece el volumen del fluido extracelular para aumentar la perfusión renal y la filtración glomerular (Schaer, 1989; Slappendel et Greene, 1990; Chew, 1992; Rubin, 1995).

Inicialmente, la fluidoterapia se realizará por vía endovenosa para asegurar un rápido acceso a la circulación y maximizar la perfusión renal y así debe continuar hasta que los signos clínicos de la uremia hayan desaparecido, el animal sea capaz de beber y comer y la azotemia disminuya y se estabilice. En este momento puede sustituirse la vía IV por la SC, pero no se cesará la administración parenteral de fluidos de forma brusca, sino que será gradualmente reducida a lo largo de varios días (Schaer, 1989; Chew, 1992).

El empleo de **diuréticos**, tales como soluciones hipertónicas de dextrosa, manitol (Chew, 1992) o furosemida (Roze et Pages, 1994; Tesouro et al, 1995c), estaría indicado en pacientes oligúricos (Bourdoiseau, 1993; Grauer et Lane, 1995), previa rehidratación completa de los mismos (Chew, 1992) o en caso de hipertensión (Ross, 1992).

El tratamiento dietético de los animales con insuficiencia renal crónica estabilizada se basa en la **reducción de la ingesta proteica** utilizando dietas con proteínas de alta calidad (Nelson *et Couto*, 1992; Polzin *et al*, 1995). Esto favorece la reducción del nitrógeno ureico y de las concentraciones de fósforo y permite una mejor calidad de vida a los pacientes con una funcionalidad renal mermada. Además, existen evidencias de que si no se reduce la ingesta proteica, la consiguiente hiperfiltración glomerular puede desembocar en glomeruloesclerosis y, por tanto, en la progresión de las lesiones renales (Nelson *et Couto*, 1992).

La aplicación de corticosteroides como parte de la terapia en las formas severas de la enfermedad y el tratamiento de las uveítis, han sido previamente comentados en el capítulo dedicado a inmunomoduladores.

Aunque las terapias de apoyo no suelen presentar ninguna contraindicación en el tratamiento de la leishmaniosis canina, sólo algunas de ellas serían estrictamente necesarias en determinadas circunstancias. La insuficiencia renal y las hemorragias graves, serían las dos complicaciones que con más frecuencia precisarían de un tratamiento de soporte asociado a la terapia específica (Tesouro *et al*, 1995c).

Evidentemente, la terapia de apoyo no puede sustituir nunca a los tratamientos específicos ya que, aunque inicialmente puede provocar una mejoría del estado general y de algunas lesiones, con el tiempo los animales se vuelven refractarios a la medicación sintomática (Buracco *et Grazi*, 1990).

PRONOSTICO E INSTAURACION DEL TRATAMIENTO

El problema práctico estriba en la decisión a tomar ante un perro con leishmaniosis: tratamiento o sacrificio (Bourdoiseau, 1993; Alvar *et al*, 1995).

Desde el **punto de vista sanitario**, el tratamiento de los perros plantearía algunos problemas, ya que no existe un criterio homogéneo en el esquema de tratamiento (Tesouro, 1995a) y muchos de los protocolos terapéuticos que se siguen son empíricos y a concentraciones subletales, lo que implicaría la selección de clones resistentes. Además, a menudo la curación clínica no se correspondería con la parasitológica, lo que permitiría la recuperación de la capacidad de infectar flebotomos, por parte de algunos perros, unos meses después del tratamiento (Alvar *et al*, 1995).

Sin embargo y teniendo en cuenta, primero, que hay pocas comunidades dispuestas a aceptar que se reduzca sin discriminación la población canina, segundo, que en zonas de baja endemicidad no está justificada esta lucha específicamente contra la leishmaniosis canina y, tercero, que un gran número de animales seropositivos serían asintomáticos (algunos trabajos arrojan cifras del 40% de los positivos (Ozon *et al*, 1995)), el sacrificio indiscriminado de los perros enfermos no sería suficiente para disminuir eficazmente el reservorio (Roze *et Pages*, 1994).

En esta situación, las campañas deberían estar principalmente dirigidas contra los perros callejeros (incontrolados) para combatir ésta y otras zoonosis (Sánchez Botija, 1936; González, 1955; OMS, 1984).

Esto se ve apoyado por estudios como el realizado por Catarsini (1989) sobre cerca de 2000 perros tratados que convivían en estrecha relación con sus dueños, con el especial riesgo de transmisión que esto supondría para los propietarios. Se encontró, no obstante, que ninguna de estas personas contrajo la enfermedad (Catarsini, 1989). Por otro lado, se han descrito casos de personas afectadas que convivían con perros no infectados. Cabría preguntarse si la eliminación del perro (principal fuente de infección) podría provocar una adaptación de los hábitos alimenticios del vector hacia el hombre. La mejor solución, lógicamente, sería la eliminación del vector, empresa de difícil consecución (Rodríguez *et al*, 1984).

En torno a 100-200 casos de leishmaniosis humana son declarados anualmente en España (Ferrer, 1992; Anuario estadístico de la Comunidad de Madrid, 1993). Aun admitiendo que estas cifras subestimen la realidad seguirían siendo muy bajas si se comparan con los 15000 perros diagnosticados por año en nuestro país (Ferrer, 1997a). Por otro lado, la infección suele ser poco peligrosa para los niños, en los que el tratamiento es generalmente eficaz. Más amenazadora es, sin duda, para los adultos inmunodeprimidos (en los que el tratamiento se revela poco efectivo) (Roze *et Pages*,1994).

Ante tal panorama, se entiende que en la actualidad un gran número de perros controlados puedan ser y, de hecho, sean tratados (Tesouro, 1995a) sin que existan razones objetivas de peso que aconsejen, desde un punto de vista sanitario, una conducta diferente. Así, los criterios clínicos parecen haber tomado relevancia a la hora de decidir la instauración del tratamiento o el sacrificio del animal (Tesouro *et al*, 1995c).

En este sentido, resulta imprescindible evaluar con extrema atención todos los elementos clínicos y laboratoriales de que disponemos: sintomatología (estado nutricional y lesiones); datos inespecíficos de laboratorio (hemograma, proteinograma y determinación de ciertos parámetros bioquímicos como la urea, la creatinina y la ALT) y datos laboratoriales específicos (titulación de anticuerpos y control parasitológico) (Tesouro *et al*, 1992a; Tesouro *et al*, 1992b). Basándose en todos estos parámetros, Tesouro y col. (1992) describen las siguientes fases en el curso de la leishmaniosis canina (Tesouro *et al*, 1992b):

- *Periodo de incubación y fases iniciales*: sin signos aparentes o con síntomas generales que pueden pasar desapercibidos (fiebre, abatimiento, pérdida de peso, lesiones cutáneas leves y/o aisladas, etc.), con una duración aproximada de 6-9 meses. Los datos inespecíficos de laboratorio son poco significativos (ligera anemia o leucopenia y aumento de las proteínas totales) o pueden no estar presentes. El proteinograma se caracteriza por un progresivo aumento de las γ -globulinas y ligero descenso de la albúmina; a veces, aparece un pico en las α_2 -globulinas que coincide con los periodos de diseminación de la enfermedad. El diagnóstico parasitológico puede ser difícil en estas fases, mientras que la tasa de anticuerpos va ascendiendo paulatinamente hasta alcanzar valores significativos (mayor o igual a 1/100, por inmunofluorescencia indirecta), lo cual se ha observado experimentalmente dentro de los cinco meses post-infección (Vitu *et al*, 1973; Abranches *et al*, 1991b; Carrera *et al*, 1996).

- **Fase de estado:** los signos clínicos suelen ser muy sugestivos de la enfermedad, con un predominio de las lesiones cutáneas o viscerales o con la presentación de un cuadro mixto. El proteinograma muestra un importante aumento de las γ -globulinas y disminución de la albúmina, lo que se traduce en un incremento marcado de las proteínas totales y un descenso del cociente albúmina/globulinas (Alb/Glo). En esta fase se consiguen los mayores porcentajes de éxito en el aislamiento del parásito, alcanzándose los valores máximos en el título de anticuerpos. En ocasiones, encontramos perros, en esta fase, aparentemente normales (*fase subclínica*) y son los datos de laboratorio los que revelan el estado real del animal.

- **Fase de agravamiento:** son estadios avanzados de la enfermedad en los que aparecen comprometidas distintas funciones orgánicas (hematopoyética, inmunitaria, hepática y/o renal) y aparecen complicaciones (gastrointestinales, enfermedades intercurrentes, etc.) que conducen, por lo general, a la muerte del animal. Los parámetros biopatológicos reflejan las afecciones orgánicas (anemia, aumentos en la urea, creatinina y ALT, etc). Las proteínas totales van descendiendo hasta, incluso, alcanzar cifras normales o por debajo de lo normal, con un proteinograma que pone de manifiesto unos valores elevados de las γ -globulinas y un descenso brusco de la albúmina, hasta dar unos perfiles muy irregulares. La tasa de anticuerpos continúa elevada, pero con valores generalmente inferiores a los de la fase anterior. El examen parasitológico suele ser positivo, pero no hay correlación entre el número de parásitos y la gravedad del proceso.

- **Fase de latencia:** Los animales son asintomáticos con parámetros biopatológicos prácticamente normales y descenso del título de anticuerpos hasta llegar a alcanzar valores no significativos. La identificación del parásito rara vez se consigue en este estadio.

En la mayoría de estas fases, a excepción de la fase de latencia, puede aparecer también una elevación más o menos marcada de las β -globulinas (Groulade, 1988).

El conocimiento del estado general y de la fase de la enfermedad en la que se encuentra el animal son de suma importancia en la emisión de un **pronóstico** y en la decisión de iniciar la terapia (Tesouro *et al*, 1995c).

La edad, la raza, el sexo y el título de anticuerpos no parecen tener influencia alguna sobre los resultados terapéuticos (Denerolle, 1996). Sin embargo, la respuesta es mejor en animales diagnosticados precozmente (Berenger, 1988) y sin apenas signos clínicos que en aquellos que presentan síntomas viscerocutáneos severos (Mancianti *et al*, 1988), siendo el pronóstico particularmente desfavorable en los perros que parten ya con un fallo hepático o renal (Reusch *et Reiter*, 1987; Slappendel, 1988; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992; Denerolle, 1996) que, además, son más susceptibles de no soportar el tratamiento (Catarsini, 1989).

La carga parasitaria, detectada en el material de biopsia, no tiene una particular significación: no se ha podido establecer ninguna conexión certera entre el número de leishmanias encontradas libres o fagocitadas y el pronóstico (Catarsini, 1989).

En cualquier caso, el pronóstico médico debe ser siempre reservado debido, por un lado, al carácter sistémico (Bourdoiseau, 1993), crónico y, en principio, incurable de la enfermedad (Núñez-Torrón *et al*, 1996) y, por otro, a la existencia de un amplio margen de imponderables que no ofrece suficiente seguridad para un juicio más preciso. Las posibilidades de evolución de la enfermedad son múltiples y no fácilmente predecibles.

El éxito de cada caso depende de todo un conjunto de factores que incluyen la virulencia del parásito, la respuesta orgánica a la infección, el estado del animal, la precocidad del diagnóstico, la gravedad de las alteraciones (cutáneas, renales, hepáticas, bioquímicas), la respuesta del organismo a la terapia específica, etc (Catarsini, 1989).

En definitiva, el diagnóstico de la leishmaniosis debe ser **precoz**, con el fin de aumentar la eficacia del tratamiento (Berenger, 1988; Mancianti *et al*, 1988; Alvar *et al*, 1995) (si es que se decide su instauración) e interrumpir la cadena epidemiológica lo antes posible (Sánchez Botija, 1936; González, 1955), y **certero**, muy especialmente en esta enfermedad en la que, en ocasiones, se decide el sacrificio del animal (Berenger, 1988; Tesouro *et al*, 1992a).

Sería recomendable, teniendo en cuenta que en la leishmaniosis la seroconversión ocurre dentro de los tres meses siguientes a la infección, realizar análisis serológicos en diciembre de cada año, de forma que los perros infectados en el período primaveral y estival previos pudieran ser detectados (Alvar *et al*, 1994).

CONTROL DEL TRATAMIENTO

En el perro los métodos terapéuticos actuales conducen, generalmente, a una **remisión** clínica más que a la curación de la enfermedad (Giauttret *et al*, 1976; Lanotte *et al*, 1979; Slappendel, 1988; Ferrer, 1992; Kontos *et Koutinas*, 1993; Alvar *et al*, 1994; Denerolle, 1996). Las **recidivas** (caracterizadas por la reaparición de la sintomatología y de alteraciones en el título de anticuerpos (Lanotte *et al*, 1979) y en el proteinograma (Tesouro *et al*, 1995c)) se presentarían, habitualmente, durante los dos años siguientes (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Longstaffe *et Guy*, 1986; Slappendel, 1988; Catarsini, 1989; Cairó, 1991; Ferrer, 1992; Franc, 1993), aunque la fase de la enfermedad en la que se instaure el tratamiento (Tesouro *et al*, 1995c), así como la presencia de enfermedades concurrentes o de situaciones de estrés, podrían influir en el tiempo hasta la aparición de dicha recidiva (Tesouro, 1984a).

La curación es rara pero posible (Roze *et Pages*, 1994). De hecho, se recogen casos de aparente curación hasta 5-7 años después del tratamiento (Longstaffe *et Guy*, 1986; Slappendel, 1988) y hay quienes llegan a conseguir una proporción de curaciones (clínicas y serológicas) de alrededor del 25-30% (Denerolle, 1996) en perros evaluados durante 2 ó 3 años (Catarsini, 1989). Algunos consideran que un caso está curado tras tres serologías negativas (realizadas cada 3-6 meses) (Roze *et Pages*, 1994).

Contrariamente, se detecta una pequeña proporción de animales en los que el tratamiento no tiene ninguna influencia sobre los síntomas y la enfermedad evoluciona de forma aguda (Lanotte *et al*, 1979). Esto también se ha observado en el kala-azar humano (Ben Said *et al*, 1977) y podría ser debido a la existencia de cepas resistentes (Fuéri *et al*, 1997).

Es más, algunos autores sostienen que las recidivas aparecerían más frecuentemente tras varios tratamientos, como consecuencia de la selección de clones resistentes de *Leishmania* (Faraut-Gambarelli *et al*, 1997). Estas recidivas serían cada vez menos espaciadas y el animal moriría en la última por una complicación infecciosa, hemorrágica o renal (Lanotte *et al*, 1979). Otros, en cambio, consideran que la duración del tratamiento hasta una nueva remisión sería menor (Groulade, 1983; Cairó *et Font*, 1991) y que las siguientes recidivas serían menos graves y se espaciarian (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Bergeaud, 1988).

Hay que tener presente, no obstante, que la disputa entre **curación incompleta y reinfección** todavía no ha sido resuelta (Kontos *et Koutinas*, 1993). En condiciones naturales parece verosímil que los animales afectados puedan reinfectarse todos los años en ausencia de medidas profilácticas, tales como la aplicación de productos insecticidas o el mantenimiento de los perros al abrigo de la picadura de los flebotomos, durante las horas de actividad del vector por lo que, a menudo, resultaría difícil distinguir entre las recidivas debidas a un tratamiento insuficiente y las reinfecciones (Lamothe, 1997).

Como se ya se ha descrito previamente, la leishmaniosis se acompaña no sólo de signos clínicos más o menos evidentes sino también de alteraciones biopatológicas y de un aumento progresivo de la tasa de anticuerpos.

Tras una terapia efectiva los síntomas van desapareciendo hasta alcanzar una fase asintomática (Tesouro, 1984a). La anemia se corrige, con aumento en el número de hematíes paralelamente al incremento del hematocrito y de la hemoglobina y el valor leucocitario se normaliza (Groulade *et al*, 1977).

La proteinuria, presente en un buen número de animales, desaparece siempre que no se acompañe de fallo renal (Slappendel, 1988). Incluso los casos con azotemia elevada y valores normales de creatinina en suero suelen tener una buena evolución (Cabassu *et al*, 1988b). No ocurre lo mismo cuando existe una insuficiencia renal y, de hecho, el tiempo de supervivencia estaría significativamente correlacionado con el estado de la función renal al iniciar el tratamiento (Slappendel, 1988).

Por consiguiente, la eficacia terapéutica no debe valorarse en función de criterios estrictamente clínicos (Giauffret *et al*, 1976), sino también en función de distintos parámetros biopatológicos (Tesouro *et al*, 1995c). Una vez instaurada la medicación antileishmaniósica y con los conocimientos que tenemos en la actualidad, dos criterios se ofrecen a los clínicos para decidir cesarla o reiniciarla: la **serología** y la **electroforesis de las proteínas séricas** (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Groulade, 1988; Berenger, 1988; Euzéby, 1988; Tesouro *et al*, 1992b; Roze *et Pages*, 1994).

Distintos estudios han demostrado la utilidad de la IFI en el control de la evolución de los casos tratados (Dunan, 1978; Roze *et Pages*, 1994; Millesimo *et al*, 1996), al contrario que otros métodos serológicos (Dot-ELISA, test de aglutinación directa, western blot) empleados para el diagnóstico de la leishmaniosis (Ferrer *et al*, 1995; Vercammen *et De Deken*, 1996; Aisa, 1997).

Aunque se ha descrito que la instauración de la terapia entraña un aumento inicial de la tasa de anticuerpos (Dunan, 1978; Pospischil *et al*, 1987), en los animales tratados con éxito, se observa una regresión de la misma entre uno y tres meses después de iniciada la medicación específica (Vitu *et al*, 1973; Dunan, 1978; Reiter *et al*, 1985).

Sin embargo y a pesar de que el título tiende a disminuir lentamente, generalmente, no se negativiza (Giauffret *et al*, 1976; Tesouro, 1984a; Denerolle, 1996). El estudio cuantitativo de los anticuerpos específicos presenta, además y según algunos autores, un interés pronóstico en el curso del tratamiento. La persistencia de tasas elevadas indicaría, habitualmente, una recaída rápida ligada a una infección visceral que persiste a pesar de la terapia específica (Giauffret *et Tallercio*, 1971).

El retorno a un trazo normal del proteinograma, con aumento de la albúmina y reducción de las β y γ -globulinas (Groulade, 1977) se alcanza entre 25 y 45 días después de la curación clínica (Groulade, 1988), entre 10 (Reiter *et al*, 1985) y 14 semanas tras iniciar la terapia (Vitu *et al*, 1973; Groulade, 1977; Tesouro, 1984a) o durante el mes que sigue al cese del tratamiento (Sanchis *et al*, 1976), según la experiencia de distintos autores. La persistencia de un pico en las α_2 -globulinas durante el tratamiento o su reaparición en periodos de remisión indicaría un estado de curación inestable (Groulade, 1988).

La vigilancia del animal debe hacerse con más frecuencia durante el período de tratamiento hasta conseguir la normalización del proteinograma (Groulade, 1988). Estos **controles iniciales** nos permitirán constatar qué tipo de respuesta se está produciendo. Si ésta es desfavorable habrá que tener en cuenta la posibilidad de que estemos ante la administración de una dosis inadecuada, una resistencia al tratamiento, el desarrollo de efectos adversos a la terapia o la existencia de un proceso asociado (Cairó, 1991; Tesouro, 1995a; Núñez-Torrón *et al*, 1996). Un descenso significativo del título de anticuerpos, tras la terapia, acompañado de la persistencia parcial o total de la sintomatología y/o de las alteraciones del proteinograma sería especialmente sugerente de la presencia de una enfermedad concurrente. Este tipo de respuesta (con descenso de la tasa de anticuerpos y persistencia de anomalías en el proteinograma) ha sido particularmente descrita en la concurrencia de leishmaniosis y ehrlichiosis canina (Sainz, 1993).

En caso de una respuesta favorable se observa una mejoría del estado general seguida, de una desaparición de la sintomatología y una normalización de los parámetros biopatológicos, tras lo cual los controles pueden espaciarse y efectuarse cada 3-6 meses (Kontos *et Koutinas*, 1993; Tesouro *et al*, 1995c; Roze *et Pages*, 1994; Ferrer, 1997b).

Realizando una **supervisión periódica** de estos parámetros y tomando como referencia los valores obtenidos una vez finalizado el tratamiento, podemos reiniciar la terapia antes de la aparición de los síntomas (Giauffret *et Tallercio*, 1971; Groulade, 1983; Tesouro *et al*, 1992b; Franc, 1993), reconduciendo el curso de la enfermedad hacia una nueva fase de remisión (Tesouro *et al*, 1992b), ya que el aumento en la tasa de anticuerpos y las perturbaciones del proteinograma preceden a la aparición de las manifestaciones clínicas (Dunan, 1978; Giauffret *et Tallercio*, 1971; Groulade, 1988; Euzeby, 1988; Tesouro *et al*, 1992b; Roze *et Pages*, 1994). Algunos autores reinstauran el tratamiento cuando se produce una elevación de dos diluciones en la titulación frente a *L. infantum* (Bourdoiseau, 1993; Franc, 1993; Euzeby, 1988).

La ventaja del proteinograma sería que sus modificaciones son más precoces y menos persistentes que las reacciones inmunológicas (Groulade, 1988) y, por tanto, permitiría valorar la eficacia terapéutica (Groulade, 1983; Denerolle, 1996) y realizar un tratamiento mejor adaptado al estado evolutivo de la enfermedad (Groulade, 1988).

Por otra parte, también resulta importante evaluar periódicamente el hemograma y las funciones hepática (mediante determinación de transaminasas) y renal (analizando la urea, la creatinina y la concentración de proteínas en orina) (Roze *et Pages*, 1994) para establecer el estado general del animal y ante la posibilidad de una complicación en alguno de estos dos órganos (Núñez-Torrón *et al*, 1996), especialmente en el riñón, ya que todos los perros leishmaniósicos son nefrópatas potenciales (Naskidachvili *et Peroux*, 1988). Los resultados permitirán precisar el pronóstico y adaptar, eventualmente, las condiciones del tratamiento si es que se opta por aplicarlo (Giauffret *et al*, 1976; Cairó, 1991; Slappendel *et Greene*, 1990).

Recientemente se ha propuesto el empleo la técnica de la PCR, como parte del programa de control de la leishmaniosis canina, de manera que el tratamiento del animal enfermo se daría por concluido cuando, además de conseguirse una desaparición de la sintomatología, unos análisis hemáticos dentro de los rangos fisiológicos y un proteinograma normal, la PCR realizada a partir de 2 muestras de médula ósea, obtenidas con 6 meses de diferencia, fueran ambas negativas. Aun así no estaría claro si estos animales se encuentran libres de parásitos. Por otro lado, se ha podido detectar la presencia de protozoos en animales aparentemente sanos, varios años después del tratamiento (Ferrer, 1997b).

Algunos autores recomiendan la **repetición de tratamientos** completos hacia el mes de junio, antes de que comience la temporada de transmisión por los flebotomos (Alvar, 1994), o tratan sistemáticamente a los animales cada 5 ó 6 meses (Euzéby, 1988; Bergeaud, 1988; Franc, 1993). Estas prácticas, encaminadas a limitar las recidivas y la transmisión de la enfermedad, son desaconsejadas por otros por considerarlas ineficaces, tóxicas, caras y peligrosas, en la medida en que constituyen un elemento favorable para la aparición de quimiorresistencia (Bourdoiseau, 1993) y porque, a menudo, no evitan la aparición de recidivas (Tesouro, 1995a). La administración periódica de alopurinol (20 mg/kg/día 1 semana al mes, indefinidamente) también ha sido propuesta como una alternativa para el control a largo plazo de la leishmaniosis canina (Ginel *et al*, 1997).

La **esperanza de vida** de los animales parece depender de la fase de la enfermedad en la que se inicie la terapia, siendo más corta a medida que ésta se administra en estadios más avanzados (Tesouro *et al*, 1985c) y, sobre todo, si la función renal está comprometida (Slappendel, 1988). La precocidad en la instauración de los segundos tratamientos prolongaría las expectativas de vida ya que las lesiones orgánicas serían menos importantes y la parasitación latente más baja (Tesouro, 1994a).

Por último, es importante que los propietarios de los perros afectados sean detalladamente informados de las características de la enfermedad y del tratamiento, incluyendo la posibilidad de transmisión, las bajas expectativas de alcanzar una curación completa, el coste económico y dedicación que supone la terapia y la importancia de controlar de forma periódica y sistemática al animal (Tesouro, 1995a; Alvar *et al*, 1995; Núñez-Torrón *et al*, 1996). La **concienciación de los propietarios** en todos estos aspectos es fundamental para obtener su máxima colaboración y poder, así, conseguir los mejores resultados terapéuticos (Martínez *et Lloret*, 1992).

PROFILAXIS

Desde hace décadas se viene trabajando en la elaboración de **vacunas** eficaces frente a este grupo de enfermedades. Numerosos estudios han sido realizados empleando parásitos muertos o atenuados y se ha podido inducir protección frente a leishmaniosis cutánea mediante inoculaciones intraperitoneales o intravenosas repetidas (Alexander, 1989). Asimismo, experimentalmente *in vivo*, se ha conseguido inmunización frente a *L. donovani* empleando promastigotes muertos asociados a adyuvantes (Holbrook *et al*, 1981). Sin embargo, la vía subcutánea ha sido, a menudo inefectiva o, incluso, ha exacerbado la infección (Alexander *et Russell*, 1992).

Estos resultados han limitado el desarrollo de una vacuna de uso humano, no sólo porque las vías de administración resultan inaceptables, sino porque se hace necesaria la aportación de protocolos seguros que no puedan exacerbar la enfermedad (Alexander, 1989).

Para evitar estos problemas, en los últimos años se ha iniciado el estudio sobre una nueva generación de vacunas basadas en criterios reduccionistas, que no utilizan el parásito entero sino algunos de sus determinantes antigénicos (Martin *et al*, 1993; Suffia *et al*, 1995) implicando una minimización de los procesos de toxicidad e intolerancia. Según las diferentes estrategias establecidas en su diseño se clasifican en vacunas recombinantes, anti-idiotipo y formadas por péptidos sintéticos (Mc Mahon-Pratt, 1993; Martín *et al*, 1993 Frankenburg *et al*, 1996; Skeiky *et al*, 1997). Su aplicación se encuentra todavía en fases tempranas, pero las expectativas de su futura utilización son extraordinariamente positivas (Martín *et al*, 1993).

Ante las actuales circunstancias y en ausencia de una vacuna eficaz disponible, la erradicación de la leishmaniosis canina es difícil debido al largo periodo de incubación de la enfermedad y a la presencia de animales asintomáticos.

Para iniciar un **programa profiláctico** sería necesario combatir los vectores, controlar los perros y determinar el papel de otros reservorios (Catarsini, 1989; Ferrer, 1992).

La lucha química antivectorial se ve impedida porque entraña el empleo de insecticidas en regiones enteras con las consiguientes consecuencias ecológicas (Catarsini, 1989). Sin embargo, se puede reducir el riesgo de transmisión limitando la exposición del hospedador vertebrado al vector, por ejemplo, manteniendo a los perros en cheniles libres de flebotomos, desde el anochecer hasta el amanecer en las épocas de máxima actividad del insecto (Slappendel, 1988) o utilizando trampas para los vectores (Catarsini, 1989).

Otras medidas propuestas incluyen el empleo de insecticidas tópicos en el hospedador (Quiles *et al*, 1979; Catarsini, 1989), collares impregnados con piretroides (Killick-Kendrick *et Killick-Kendrick*, 1997) y mosquiteras de malla fina (Quiles *et al*, 1979; Slappendel, 1988; Bourdoiseau, 1993) rociadas con permetrina (Maroli *et Lani*, 1989). Estas acciones deben iniciarse justo antes del pico de densidad del vector y repetirse periódicamente hasta que finalice la época de actividad del mismo (OMS, 1990).

En lo que se refiere a la lucha dirigida directamente contra el reservorio, hay que tener en cuenta que, a pesar de ser un importante problema veterinario en Europa, la destrucción a gran escala de perros afectados es imposible y que, aunque hay evidencias de que existe una buena correlación entre la tasa de anticuerpos y condición clínica del perro y la capacidad de éste para infectar flebotomos (Dye, 1996), animales asintomáticos pueden también transmitir la enfermedad (Molina *et al*, 1994a; Alvar *et al*, 1994). En consecuencia, la erradicación de perros vagabundos e incontrolados (Catarsini, 1989; OMS, 1990; Ferrer, 1992) y la detección y tratamiento precoz de los afectados (Mancianti *et al*, 1988; Gradoni *et al*, 1988; OMS, 1990; Kontos *et Koutinas*, 1993) constituirían, junto con las anteriores, importantes medidas para el control de la leishmaniosis canina.

MATERIALES Y METODOS

ESTUDIO RETROSPECTIVO

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos y dar respuesta a cuestiones relativas a la evolución de distintos parámetros clínicos en el curso del tratamiento de la leishmaniosis canina, lo primero que hicimos fue confeccionar una **ficha** en la que recogimos, de forma homogénea, los datos más relevantes de cada caso incluido en este estudio, tanto en el momento del diagnóstico como en los distintos controles realizados durante todo el tiempo de seguimiento tras la instauración de una terapia específica:

NOMBRE:	Sexo:	Edad:	Nº registro:		
FECHA DIAGNOSTICO:					
FASE DE ENFERMEDAD: <i>Inicial / Estado / Avanzada</i>					
SINTOMAS:					
TITULO IFI:					
PROTEINAS TOTALES: Alb: α -glo: β -glo: γ -glo: Alb/Glo:					
Urea:		Creatinina:		ALT:	
TRATAMIENTO:					

FECHA CONTROL EVOLUCION:					
SINTOMAS:					
TITULO IFI:					
PROTEINAS TOTALES: Alb: α -glo: β -glo: γ -glo: Alb/Glo:					
Urea:		Creatinina:		ALT:	
TRATAMIENTO:					

Los casos fueron seleccionados de entre aquellos atendidos en las consultas de la Facultad de Veterinaria de Madrid entre los años 1986 y 1993. Para ello, tuvimos acceso al archivo general, a partir del cual, fueron revisadas más de 400 historias clínicas que reflejaban un diagnóstico de leishmaniosis canina.

De todas ellas, se consideraron aptas para nuestro estudio las relativas a los perros que, una vez diagnosticados mediante métodos parasitológicos (observación directa del parásito) y/o inmunológicos ($IFI \geq 1/100$), fueron sometidos a una terapia específica y a un seguimiento posterior, en el que se detallara la evolución del caso para valorar la respuesta a dicho tratamiento. Finalmente, un total de 104 casos clínicos fueron incluidos en este estudio retrospectivo.

Los casos integrados en dicho estudio fueron clasificados según el **sexo**, la **edad**, la **fase de la enfermedad** en que se encontraban en el momento del diagnóstico y el **tratamiento específico** recibido.

Los criterios de clasificación en función de la **edad** de los animales en el momento del diagnóstico fueron los siguientes:

- **Jóvenes:** hasta 2 años de edad.
- **Adultos:** mayores de 2 años y menores de 8 años.
- **Viejos:** a partir de 8 años de edad.

Los animales fueron incluidos, según la **fase de la enfermedad** en la que se encontraban en el momento del diagnóstico, en los grupos que se detallan a continuación. En esta clasificación hemos seguido los criterios señalados por Tesouro y col. (1992) (**Tesouro, 1992b**), estableciendo los tres grupos siguientes:

- **Fase I:** incluye el periodo de incubación y fases iniciales de la enfermedad. Clínicamente los animales no presentan síntomas o éstos son moderados e inespecíficos. Analíticamente se caracteriza, fundamentalmente, por una disproteinemia poco marcada o incluso nula, manteniendo prácticamente normales los valores de albúmina sérica y por presentar títulos positivos, por $IFI, \leq 1/800$.

- **Fase E:** se corresponde con las fases de estado de la enfermedad. Los animales presentan uno de los cuadros clínicos (cutáneo, visceral o mixto) característicos de la leishmaniosis canina. Las alteraciones biopatológicas son diversas según los órganos afectados; la disproteinemia está representada por una elevación muy evidente de las γ -globulinas, generalmente acompañada de un aumento de las β -globulinas, lo que determina el incremento de las proteínas séricas totales en estos estadios de la enfermedad. En todos los casos los títulos por IFI son $\geq 1/400$.

- **Fase A:** incluye las fases avanzadas de la enfermedad, que se caracterizan por la presencia de complicaciones orgánicas (renales, hepáticas, cardíacas, etc.) graves o irreversibles. Los análisis clínicos reflejan estas complicaciones, encontrándose importantes alteraciones biopatológicas. El perfil del proteinograma y la tasa de anticuerpos específico son variables obteniéndose, en ocasiones, títulos inferiores que en la fase anterior.

Atendiendo al **tratamiento específico** empleado en cada uno de los casos clínicos de nuestro estudio confeccionamos la siguiente clasificación:

- **Grupo G1 :** Glucantime® a dosis entre >100 y 150 mg/kg/día, por vía intramuscular, en ciclos de 20 inyecciones en el periodo de 1 mes (dos tandas de 10 inyecciones, inyecciones en días alternos, etc).

- **Grupo G2 :** Glucantime® a dosis entre 50 y 100 mg/kg/día, por vía intramuscular, en ciclos de 20 inyecciones en el periodo de un mes.

- **Grupo G1+Z :** Glucantime® a dosis entre >100 y 150 mg/kg/día, por vía intramuscular, en ciclos 20 inyecciones en el periodo de 1 mes, asociado a Zyloric® a dosis entre 10 y 20 mg/kg/día.

- **Grupo G2+Z :** Glucantime® a dosis entre 50 y 100 mg/kg/día, por vía intramuscular, en ciclos 20 inyecciones en el periodo de 1 mes, asociado a Zyloric® a dosis de 10 mg/kg/día.

Una vez definida esta clasificación, se procedió al estudio de la evolución clínica y biopatológica a corto, medio y largo plazo, incluyendo la respuesta inicial a la terapia recibida, las remisiones y recidivas a lo largo del seguimiento, así como la dinámica de anticuerpos específicos y del cociente Alb/Glo de los distintos grupos establecidos.

La **respuesta a corto plazo**, dentro de los dos primeros meses tras el inicio de la terapia, fue clasificada atendiendo a los siguientes requisitos:

- **Muy Favorable:** desaparición o mejoría evidente de los síntomas, tendencia a la normalización del proteinograma y descenso del título de anticuerpos.

- **Favorable:** falta uno de los tres supuestos anteriores o se presentan en grado moderado.

- **Nula:** la sintomatología y las alteraciones biopatológicas se mantienen más o menos estables y la tasa de anticuerpos puede, incluso, aumentar.

- **Desfavorable:** empeoramiento de la sintomatología y de las alteraciones biopatológicas; generalmente, se produce por una complicación renal que suele conducir a la muerte del animal.

Para valorar la **respuesta a medio y largo plazo**, los criterios que definen la consecución de una remisión y la aparición de una recidiva quedaron establecidos de la forma que sigue:

- **Remisión:** desaparición de la sintomatología, normalización del proteinograma y descenso del título de anticuerpos. La consecución de la remisión determina la finalización de la terapia, de manera que los ciclos de tratamiento se sucedían hasta lograr ésta.

- **Recidiva:** aparición de sintomatología compatible con la enfermedad, alteración del proteinograma y/o aumento significativo del título de anticuerpos con respecto al último control. La aparición de la recidiva determinaba la reinstauración de la terapia.

La evolución del **título de anticuerpos** y del cociente **Alb/Glo**, a lo largo de un periodo de un año de permanencia en remisión fue estudiada atendiendo al título y cociente iniciales (en el momento del diagnóstico). En este sentido, los casos fueron clasificados en las siguientes categorías:

- Título inicial: 1/100	- Alb/Glo inicial: < 0.2
- Título inicial: 1/200	- Alb/Glo inicial: 0.2 - 0.39
- Título inicial: 1/400	- Alb/Glo inicial: 0.4 - 0.59
- Título inicial: 1/800	- Alb/Glo inicial: 0.6 - 0.79
- Título inicial: 1/1600	- Alb/Glo inicial: > 0.79
- Título inicial: 1/3200	
- Título inicial: 1/6400	

Al igual que en la evolución del título de anticuerpos y del cociente **Alb/Glo**, en el análisis de los periodos de **presentación de recidivas** y de **permanencia en remisión**, se consideró el tiempo transcurrido desde el momento de instauración de la terapia.

ESTUDIO PROSPECTIVO

En este estudio se incluyeron 61 perros de diferente raza, edad y sexo, atendidos entre los años 1993-1996 en las Consultas de la Facultad de Veterinaria de Madrid y diagnosticados de leishmaniosis por el Servicio de Diagnóstico de Leishmaniosis de esta misma Facultad, mediante técnicas específicas parasitológicas (observación directa del parásito) y/o inmunológicas ($IFI \geq 1/100$) (Tesouro, 1984a).

Los perros fueron inicialmente evaluados mediante examen físico y biopatológico con el fin de determinar el estado general de los animales, la fase de la enfermedad y las posibilidades de éxito terapéutico.

Con el fin de caracterizar la población de nuestro estudio y valorar la respuesta a la terapia los casos fueron clasificados en función del sexo, la edad y de la fase de la enfermedad en el momento de diagnóstico, siguiendo los mismos criterios que en el estudio retrospectivo. Asimismo, estos casos fueron clasificados según el peso, la presencia o no de afección hepática y/o renal y atendiendo al cuadro clínico (Asintomático, Cutáneo, Visceral y Mixto) que presentaron en el momento del diagnóstico.

Tras informar detalladamente a los propietarios de las características de este proceso y una vez decidida la instauración del tratamiento se les instruyó sobre la pauta y forma de administración de los fármacos atendiendo al siguiente protocolo terapéutico:

1) Tratamiento (G1+Z-SC)

En cada ciclo de tratamiento se empleó Glucantime® por vía subcutánea, a la dosis de 150 mg de antimonio de meglumine/kg/día en dos tandas de 10 días separadas por 10 días de descanso (hasta un máximo de 4500 mg/animal/día), asociado a alopurinol (Zyloric®) por vía oral, a la dosis de 10 mg/kg/12 h durante 45 días sin interrupción, iniciándose la administración de ambos fármacos el mismo día.

El empleo de una terapia de apoyo fue limitada a unos pocos casos en los que se consideró que la sintomatología asociada así lo requería. La fluidoterapia y/o la restricción de proteínas en la dieta fueron incluidas en el tratamiento de los pacientes que se presentaron con una insuficiencia renal. Los animales con alteraciones digestivas (vómitos, diarrea, etc.) fueron tratados sintomáticamente con antieméticos, protectores de la mucosa, dietas especiales, etc. En los casos con insuficiencia hepática la alimentación se basó en preparados comerciales adecuados para dicha afección. Por último, en los perros con uveítis asociada, se empleó medicación tópica apropiada en forma de colirios con corticosteroides, atropina y antibióticos y de inyecciones subconjuntivales de metilprednisolona.

En función de la respuesta a la terapia los animales podrían ser sometidos a nuevos ciclos de tratamiento.

2) Control del tratamiento

Los animales fueron controlados clínica y biopatológicamente antes de iniciar la terapia y entre 15 y 30 días después de finalizar el primer ciclo tratamiento. En este control se valoró la **respuesta a corto plazo** (siguiendo los mismos criterios que en el estudio retrospectivo). En los perros cuyo estado general lo precisó, los controles (especialmente los de tipo biopatológico) se realizaron, incluso, durante la administración de la terapia prescrita.

Cuando, tras la finalización del primer ciclo, los resultados recogidos en el control aconsejaron la administración de un nuevo ciclo se repitió, a continuación, el mismo protocolo de tratamiento, realizándose un nuevo control al finalizar el mismo. Los ciclos de tratamiento podían repetirse varias veces, considerándose concluido éste cuando se hubiera alcanzado la remisión. Los criterios seguidos para considerar la consecución de la remisión (**respuesta a medio plazo**) coinciden con los expuestos para el estudio retrospectivo.

Además y al igual que en el estudio anterior, para valorar la **respuesta a largo plazo** en los perros que alcanzaron la remisión se llevaron a cabo una serie de controles programados, cuyo número y periodicidad estuvieron sujetos a pequeñas variaciones en función de la disponibilidad de los propietarios. Estos controles se realizaron, aproximadamente, cada 3 meses durante el tiempo que duró el periodo de supervisión de cada animal. La detección de una recidiva determinaba la reinstauración de la terapia.

Los datos obtenidos de la exploración y de la analítica, tanto en el momento inicial como en los diferentes controles, fueron recopilados en una **ficha** que incluía un mayor número de variables que la del estudio retrospectivo:

NOMBRE:	Raza:	Sexo:			
Nº registro:	Edad:	Peso:			
FECHA DIAGNOSTICO:					
FASE DE ENFERMEDAD: Inicial / Estado / Avanzada					
SINTOMAS:					
TITULO IFI:					
PROTEINAS TOTALES: Alb: α -glo: β -glo: γ -glo: Alb/Glo:					
Urea:	Creatinina:	ALT:			
Hematocrito:	Hemoglobina:	Hematíes:		Leucocitos:	
Neutrófilos:	Linfocitos:	Eosinófilos:		Monocitos:	
TRATAMIENTO:					

FECHA CONTROL EVOLUCION:					
SINTOMAS:					
TITULO IFI:					
PROTEINAS TOTALES:	Alb:	α -glo:	β -glo:	γ -glo:	Alb/Glo:
Urea:		Creatinina:		ALT:	
Hematocrito:		Hemoglobina:		Hematíes:	Leucocitos:
Neutrófilos:		Linfocitos:		Eosinófilos:	Monocitos:
TRATAMIENTO:					

En cada uno de estos controles, se recogían muestras de sangre de la vena cefálica (en EDTA, en heparina) para la realización del **control biopatológico e inmunológico** que incluía los parámetros indicados en la ficha.

El **título de anticuerpos anti-*L.infantum***, utilizado en el diagnóstico específico y posterior control de los animales tratados, fue valorado por la técnica de IFI adaptada por Tesouro (1984) (Tesouro, 1994a).

El **hemograma** (hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos y recuento de glóbulos blancos) fueron analizados empleando el contador hematológico Microcell counter F-800 (Sysmex®). La fórmula leucocitaria fue determinada, en extensión de sangre teñida con May Grünwald-Giemsa®, por recuento de 100 células blancas al microscopio óptico.

Las **proteínas plasmáticas** totales fueron valoradas mediante refractometría (Atago Co.,Ltd). La técnica empleada para calcular la albúmina, las α , β y γ -globulinas y el cociente albúmina/globulina, fue la separación electroforética de las proteínas utilizando la metodología y los materiales recomendados por Atom®.

Los valores de **ALT (GPT)**, **urea** y **creatinina** fueron obtenidos con el analizador de química seca Reflotrón® (Boehringer Mannheim), trabajando a 25°C.

Para la interpretación y clasificación de los parámetros del proteinograma y del hemograma se consideraron como valores de referencia los aportados por Bush (1991) y para la bioquímica seca los proporcionados por el laboratorio fabricante del analizador Reflotron®.

En este estudio prospectivo se analizó, no sólo la dinámica del **título de anticuerpos** y del **cociente Alb/Glo**, sino también la evolución del resto de los parámetros biopatológicos valorados, a lo largo de un año de seguimiento, en el grupo de animales que alcanzó la remisión y la mantuvo durante este periodo de supervisión.

Al igual que para la evolución de los parámetros biopatológicos que acabamos exponer, para el análisis de los **periodos de presentación de recidiva** y de **permanencia en remisión** se consideró el tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico.

Los datos clínicos y biopatológicos obtenidos en el momento del diagnóstico y en el de la remisión se utilizaron para caracterizar la respuesta terapéutica, así como para determinar las posibles variables que actuaran como factores con valor pronóstico.

ANALISIS DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se realizó en el Centro de Proceso de Datos de la U.C.M utilizando el programa BMDP (OPENVMS AXP VERSION V6.2, de BMDP SOFTWARE, INC. USA). También se empleó el programa informático SIGMA (HORUS HARDWARE, 1987). Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes:

- Para la descripción de las muestras se emplearon tests de estadística básica y descriptiva.

- Para comparar las distribuciones de las distintas variables cualitativas se utilizaron los test de chi cuadrado (χ^2) y de comparación de porcentajes.

- Para la comparación de dos medias se empleo el test de la *t* Student. Cuando estas comparaciones se realizaron entre dos medidas repetidas se aplicaron los tests de la *t* pareada y de Wilcoxon.

- Para la comparación de múltiples medias se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para uno y para dos factores completado con el método Bonferroni.

- Las asociaciones entre las variables cualitativas fueron determinadas utilizando el test de χ^2 , seguido del test de comparación de porcentajes (entre las distintas categorías y el global).

- Las relaciones entre las variables cualitativas y las cuantitativas se hallaron mediante el análisis de varianza de comparación de múltiples medias (ANOVA), seguido del cálculo del valor de la *F* de Snédécór para comprobar la homogeneidad entre las dispersiones de cada categoría con la global.

- Las relaciones entre las variables cuantitativas fueron valoradas calculando los coeficientes de correlación entre las mismas.

- Para estudiar la evolución del título de anticuerpos y del cociente Alb/Glo se calcularon las correspondientes ecuaciones de regresión de las curvas que mejor se ajustaron a dicha dinámica.

- Para verificar si una distribución se ajustó a una curva de probabilidad normal se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

- Para el análisis de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier. Las distribuciones de las tasas de supervivencia acumulada de los distintos grupos fueron comparadas por los tests de Mantel-Cox, Tarone-Ware y Breslow.

- Para seleccionar y cuantificar el efecto de las distintas variables que se muestran como factores de riesgo para que se produzca o no un suceso (odds ratio), se utilizó el método de regresión logística (o análisis multivariante).

Para la interpretación de los resultados fueron consultados los textos de Carrasco de la Peña (1982) y de Palmer (1986) (Carrasco de la Peña, 1982; Palmer, 1986), así como los manuales correspondientes a los programas estadísticos utilizados.

RESULTADOS

ESTUDIO RETROSPECTIVO

La totalidad de las historias clínicas ($n = 104$) de nuestro estudio retrospectivo recoge el empleo de antimonio de meglumine (Glucantime®), administrado por vía intramuscular siguiendo diferentes pautas terapéuticas, asociado o no a alopurinol (Zyloric®). Los 104 casos quedaron distribuidos, según el protocolo de tratamiento recibido, en cuatro grupos (G1, G1+Z, G2 y G2+Z) cuyas características quedaron detalladas en el capítulo dedicado a materiales y métodos.

R.I- DESCRIPCION DE LA MUESTRA

Atendiendo a la clasificación expuesta en materiales y métodos, la distribución de los 104 casos clínicos seleccionados en función del sexo, la edad, la fase de la enfermedad y el tratamiento específico instaurado en el momento del diagnóstico fue la que se muestra en las figuras R.I.1, R.I.2, R.I.3 y R.I.4.

Fig R.I.1 - DISTRIBUCION SEGUN SEXO $n = 104$

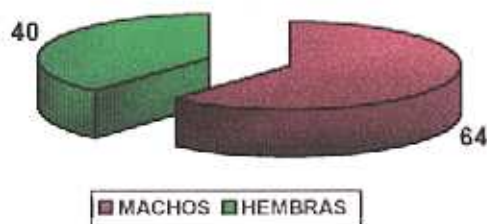


Fig R.I.2 - DISTRIBUCION SEGUN EDAD $n = 104$

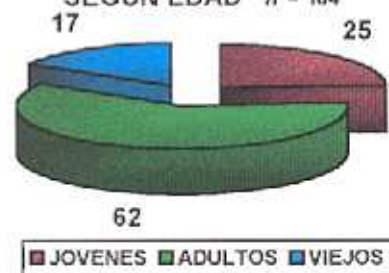


Fig R.I.3 - DISTRIBUCION SEGUN FASE $n = 104$

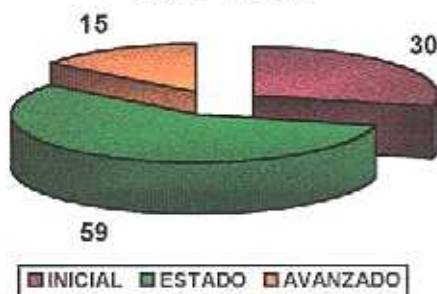
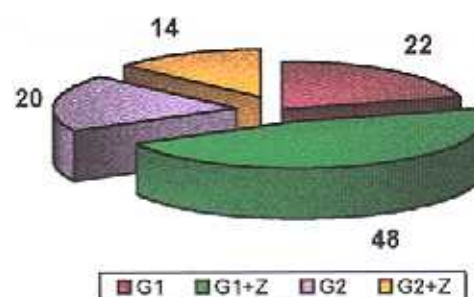


Fig R.I.4 - DISTRIBUCION SEGUN TRATAMIENTO $n = 104$



R.II- RESPUESTA A CORTO PLAZO

El primer interrogante que nos planteamos fue determinar la respuesta inmediata a la terapia, que denominamos respuesta a corto plazo. Dicha respuesta fue valorada atendiendo a los controles realizados dentro de los dos primeros meses tras el inicio del tratamiento, dando tiempo a que finalizara el primer ciclo en la mayoría de los casos. No obstante, algunos de estos perros no llegaron a recibir un ciclo completo debido a que murieron o fueron sacrificados antes de finalizarlo.

Esta respuesta a corto plazo fue clasificada, según los criterios expuestos en materiales y métodos, en: **muy favorable, favorable, nula y desfavorable**.

R.II.A -. TIPO DE TRATAMIENTO/RESPUESTA A CORTO PLAZO

Atendiendo a la respuesta clínica de los distintos grupos, en función de la terapia administrada tras el diagnóstico de la enfermedad, obtuvimos los resultados expuestos en la tabla R.II.A.1.

RESPUESTA A CORTO PLAZO / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1	13	2	1	6	22
G2	5	6	4	5	20
G1+Z	31	8	3	6	48
G2+Z	5	6	1	2	14
TOTAL	54	22	9	19	104

$\chi^2 = 17.257$ g.l.: 9 $p = 0.0448$

Tabla R.II.A.1 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido.

Los resultados obtenidos en cada uno de estos grupos fueron comparados, una vez establecidas las correspondientes tablas de asociación, por el test de χ^2 (tablas R.II.A.1-4).

RESPUESTA A CORTO PLAZO / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1	13	2	1	6	22
G1+Z	31	8	3	6	48
TOTAL	44	10	4	12	70

$\chi^2 = 2.676$ g.l.: 3 $p = 0.4444$

Tabla R.II.A.2 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido (para dosis diarias altas de Glucantime® asociado y no asociado a Zyloric®).

RESPUESTA A CORTO PLAZO / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G2	5	6	4	5	20
G2+Z	5	6	1	2	14
TOTAL	10	12	5	7	34

$\chi^2 = 2.092$ g.l.:3 $p = 0.5535$

Tabla R.II.A.3 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido (para dosis diarias bajas de Glucantime® asociado y no asociado a Zyloric®).

RESPUESTA A CORTO PLAZO / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	44	10	4	12	70
G2/G2+Z	10	12	5	7	34
TOTAL	54	22	9	19	104

$\chi^2 = 11.991$ g.l.:3 $p = 0.007412$

Tabla R.II.A.4 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido (para dosis diarias altas y bajas de Glucantime® independientemente del empleo de Zyloric®).

El análisis estadístico demuestra que las respuestas obtenidas, dentro de los dos primeros meses post-tratamiento, presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en función del protocolo terapéutico empleado (tabla R.II.A.1). Sin embargo, tales diferencias no pueden atribuirse a la administración o no de alopurinol (tablas R.II.A.2 y R.II.A.3).

Como refleja la tabla R.II.A.4, las diferencias en la respuesta a corto plazo fueron significativas al comparar las distintas dosis de Glucantime® utilizadas en el tratamiento, obteniéndose más de un 62% (44/70 casos) de respuestas muy favorables cuando se emplearon dosis de antimoniato de meglumine mayores de 100 mg/kg/día (G1/G1+Z) frente al 29.4% (10/34 casos) de respuestas muy favorables observado con dosis menores o iguales a 100 mg/kg/día (G2/G2+Z) ($p < 0.01$).

La ausencia de diferencias significativas en la respuesta inicial entre la población que recibió y la que no recibió alopurinol, nos permitió la reagrupación de los protocolos de tratamiento según la dosis de Glucantime® administrada. Así, cuando estudiamos las posibles asociaciones entre la fase, el sexo o la edad y el tratamiento, dentro de esta respuesta inicial, pudimos trabajar con dos grupos terapéuticos: G1/G1+Z (dosis altas de Glucantime® asociado o no a alopurinol) y G2/G2+Z (dosis bajas de Glucantime® asociado o no a alopurinol).

R.II.B - FASE DE LA ENFERMEDAD/RESPUESTA A CORTO PLAZO

Un hecho bien conocido, en la leishmaniosis canina, es la diferente respuesta al tratamiento según gravedad y el tiempo que lleve instaurado el proceso al que nos enfrentemos. Para confirmar esta presunción y poder interpretar correctamente los resultados de nuestro estudio, los casos clínicos fueron clasificados, como quedó expuesto en materiales y métodos, en tres grupos atendiendo a la fase de la enfermedad en que se encontraban los animales en el momento de la instauración del tratamiento específico: **Fase I**, **Fase E** y **Fase A**. A partir de esta clasificación y conforme a la respuesta inicial obtenida, podemos establecer la siguiente tabla de contingencia (tabla R.II.B.1):

RESPUESTA A CORTO PLAZO / FASE	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I	25	3	1	1	30
FASE E	28	18	8	5	59
FASE A	1	1	0	13	15
TOTAL	54	22	9	19	104

$\chi^2 = 66.629$ g.l.:6 $p = 1.840E-12$

Tabla R.II.B.1 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

El estudio estadístico confirma que las respuestas obtenidas, independientemente de la terapia empleada, difieren muy significativamente según la fase de la enfermedad en que se instauró el tratamiento ($p < 0.01$) (tabla R.II.B.1). Efectivamente, registramos una respuesta a corto plazo muy favorable, cuando los tratamientos se iniciaron en los periodos de incubación y fases iniciales, en un 83.3% (25/30) de los casos. Por el contrario, los peores resultados fueron observados en las fases avanzadas, en las que tan sólo un 13.3% (2/15) de los animales presentó una buena respuesta (favorable o muy favorable). En las fases de estado la respuesta inmediata muy favorable al tratamiento se estimó en torno a un 50% (28/59) de los perros.

De igual forma confirmamos, mediante el test de χ^2 , cómo estas diferencias, en función de la fase de la enfermedad, se mantuvieron para los grupos de tratamiento G1/G1+Z y G2/G2+Z considerados por separado (tablas R.II.B.2 y R.II.B.3).

RESPUESTA A CORTO PLAZO (G1/G1+Z) / FASE	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I	19	1	1	1	22
FASE E	24	8	3	4	39
FASE A	1	1	0	7	9
TOTAL	44	10	4	12	70

$$\chi^2 = 31.613 \quad \text{g.l.:6} \quad p = 1.935E-05$$

Tabla R.II.B.2 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo, en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico, para el tratamiento con dosis diarias altas de Glucantime® (independientemente del empleo de Zyloric®).

RESPUESTA A CORTO PLAZO (G2/G2+Z) / FASE	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I	6	2	0	0	8
FASE E	4	10	5	1	20
FASE A	0	0	0	6	6
TOTAL	10	12	5	7	34

$$\chi^2 = 37.489 \quad \text{g.l.:6} \quad p = 1.414E-06$$

Tabla R.II.B.3 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo, en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico, para el tratamiento con dosis diarias bajas de Glucantime® (independientemente del empleo de Zyloric®).

Destacamos cómo las mayores diferencias en la respuesta inmediata al tratamiento, según la dosis de Glucantime® utilizada, aparecieron en las fases de estado de la enfermedad: un 61.5% (24/39 casos) de respuesta muy favorable para G1/G1+Z frente a un 20% (4/20 casos) de respuesta muy favorable para G2/G2+Z.

Esto sugiere la existencia de diferencias significativas en función de la fase y del tipo de tratamiento conjuntamente. Para confirmar esta hipótesis, previamente había que comprobar que la distribución de los casos según la fase de la enfermedad, para cada grupo de tratamiento, podía considerarse homogénea (tabla R.II.B.4).

TRATAMIENTO/ FASE	G1/G1+Z <i>n</i>	G2/G2+Z <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I	22	8	30
FASE E	39	20	59
FASE A	9	6	15
TOTAL	70	34	104

$$\chi^2 = 0.898 \quad \text{g.l.: 2} \quad p = 0.6383$$

Tabla R.II.B.4 - Distribución del tipo de tratamiento recibido en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

La inexistencia de diferencias significativas en esta distribución (tabla R.II.B.4) ratifica la homogeneidad entre los grupos considerados y permite comparar las respuestas según las distintas fases y dosis de Glucantime® administrada (tabla R.II.B.5).

RESPUESTA A CORTO PLAZO / FASE (TRATAMIENTO)	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I (G1/G1+Z)	19	1	1	1	22
FASE I (G2/G2+Z)	6	2	0	0	8
FASE E (G1/G1+Z)	24	8	3	4	39
FASE E (G2/G2+Z)	4	10	5	1	20
FASE A (G1/G1+Z)	1	1	0	7	9
FASE A (G2/G2+Z)	0	0	0	6	6
TOTAL	54	22	9	19	104

$$\chi^2 = 84.014 \quad \text{g.l.: 15} \quad p = 4.486E-07$$

Tabla R.II.B.5 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función de la fase de la enfermedad y del tratamiento recibido.

Los tests de χ^2 (tablas R.II.B.6 y R.II.B.7) precisaron que las diferencias de respuesta a corto plazo, según la dosis de Glucantime®, sólo fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en la fase de estado, sin que pudiera apreciarse una influencia de la posología empleada sobre esta respuesta, en los animales diagnosticados en las fases iniciales de la enfermedad. La fase avanzada quedó excluida de este estudio estadístico debido al reducido número de casos.

RESPUESTA A CORTO PLAZO (FASE I) / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	19	1	1	1	22
G2/G2+Z	6	2	0	0	8
TOTAL	25	3	1	1	30

$$\chi^2 = 3.273 \quad \text{g.l.:3} \quad p = 0.3515$$

Tabla R.II.B.6 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido, para los perros diagnosticados en fase inicial de la enfermedad.

RESPUESTA A CORTO PLAZO (FASE E) / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	24	8	3	4	39
G2/G2+Z	4	10	5	1	20
TOTAL	28	18	8	5	59

$$\chi^2 = 11.926 \quad \text{g.l.:3} \quad p = 7.640E-03$$

Tabla R.II.B.7 - Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido, para los perros diagnosticados en fase de estado de la enfermedad.

R.II.C - EDAD/RESPUESTA A CORTO PLAZO

Otra cuestión que consideramos interesante analizar fue la influencia de la edad de los animales, en el momento de instaurar el tratamiento, sobre la respuesta inicial al mismo. Para ello dividimos los casos clínicos en tres grupos de edades: **Jóvenes, Adultos y Viejos**.

Estadísticamente se comprobó que las diferencias observadas en las respuestas inmediatas a la instauración de la terapia, en función de las diferentes edades, podían ser atribuidas al azar, incluso cuando se consideró el tipo de tratamiento aplicado (tablas R.II.C.1-5).

TRATAMIENTO / EDAD	G1/G1+Z <i>n</i>	G2/G2+Z <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
JOVENES	19	6	25
ADULTOS	37	25	62
VIEJOS	14	3	17
TOTAL	70	34	104

$$\chi^2 = 4.248 \quad \text{g.l.: 2} \quad p = 0.1196$$

Tabla R.II.C.1 - Distribución del tipo de tratamiento recibido en función de la edad en el momento del diagnóstico.

RESPUESTA A CORTO PLAZO / EDAD	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
JOVENES	14	5	0	6	25
ADULTOS	30	15	8	9	62
VIEJOS	10	2	1	4	17
TOTAL	54	22	9	19	104

$$\chi^2 = 6.173$$

g.l.:6

$$p = 0.4041$$

Tabla R.II.C.2 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función de la edad en el momento del diagnóstico.

RESPUESTA A CORTO PLAZO / EDAD (G1+G1+Z)	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
JOVENES	13	3	0	3	19
ADULTOS	22	6	3	6	37
VIEJOS	9	1	1	3	14
TOTAL	44	10	4	12	70

$$\chi^2 = 2.488$$

g.l.:6

$$p = 0.8698$$

Tabla R.II.C.3 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función de la edad en el momento del diagnóstico, para el tratamiento con dosis diarias altas de Glucantime® (independientemente del empleo de Zyloric®).

RESPUESTA A CORTO PLAZO / EDAD (G2/G2+Z)	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
JOVENES	1	2	0	3	6
ADULTOS	8	9	5	3	25
VIEJOS	1	1	0	1	3
TOTAL	10	12	5	7	34

$$\chi^2 = 5.871$$

g.l.:6

$$p = 0.4378$$

Tabla R.II.C.4 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función de la edad en el momento del diagnóstico, para el tratamiento con dosis diarias bajas de Glucantime® (independientemente del empleo de Zyloric®).

RESPUESTA A CORTO PLAZO / EDAD (TRATAMIENTO)	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
JOVENES (G1/G1+Z)	13	3	0	3	19
JOVENES (G2/G2+Z)	1	2	0	3	6
ADULTOS (G1/G1+Z)	22	6	3	6	37
ADULTOS (G2/G2+Z)	8	9	5	3	25
VIEJOS (G1/G1+Z)	9	1	1	3	14
VIEJOS (G2/G2+Z)	1	1	0	1	3
TOTAL	54	22	9	19	104

$$\chi^2 = 21.215 \quad \text{g.l.: 15} \quad p = 0.1301$$

Tabla R.II.C.5 – Distribución de la respuesta a corto plazo en función de la edad en el momento del diagnóstico, para los distintos tratamientos recibidos (independientemente del empleo de Zyloric®).

R.II.D - SEXO/RESPUESTA A CORTO PLAZO

Del mismo modo, quisimos comprobar si el sexo de los animales influía o no en la respuesta inmediata al tratamiento.

Tras el análisis estadístico, la inexistencia de diferencias significativas demostró que el tipo respuesta a corto plazo era independiente de que los perros fueran machos o hembras, tanto cuando se consideró el tipo de tratamiento como cuando no se consideró (tablas R.II.D.1-5).

TRATAMIENTO / SEXO	G1/G1+Z <i>n</i>	G2/G2+Z <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
MACHOS	43	21	64
HEMRAS	27	13	40
TOTAL	70	34	104

$$\chi^2 = 0.033046 \quad \text{g.l.: 1} \quad p = 0.85575$$

Tabla R.II.D.1 - Distribución del tipo de tratamiento en función del sexo.

RESPUESTA A CORTO PLAZO / SEXO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
MACHOS	33	14	7	10	64
HEMBRAS	21	8	2	9	40
TOTAL	54	22	9	19	104

$$\chi^2 = 1.6847 \quad \text{g.l.:3} \quad p = 0.64034$$

TABLA R.II.D.2 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del sexo.

RESPUESTA A CORTO PLAZO (G1/G1+Z) / SEXO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
MACHOS	27	7	3	6	43
HEMBRAS	17	3	1	6	27
TOTAL	44	10	4	12	70

$$\chi^2 = 1.2826 \quad \text{g.l.:3} \quad p = 0.73327$$

Tabla R.II.D.3 - Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del sexo, para el tratamiento con dosis diarias altas de Glucantime® (independientemente del empleo de Zyloric®).

RESPUESTA A CORTO PLAZO (G2/G2+Z) / SEXO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
MACHOS	6	7	4	4	21
HEMBRAS	4	5	1	3	13
TOTAL	10	12	5	7	34

$$\chi^2 = 0.84036 \quad \text{g.l.:3} \quad p = 0.83979$$

Tabla R.II.D.4 - Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del sexo, para el tratamiento con dosis diarias bajas de Glucantime® (independientemente del empleo de Zyloric®).

RESPUESTA A CORTO PLAZO / SEXO (TRATAMIENTO)	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
MACHOS G1/G1+Z	27	7	3	6	43
MACHOS G2/G2+Z	6	7	4	4	21
HEMBRAS G1/G1+Z	17	3	1	6	27
HEMBRAS G2/G2+Z	4	5	1	3	13
TOTAL	54	22	9	19	104

$$\chi^2 = 14.402 \quad \text{g.l.:9} \quad p = 0.1087$$

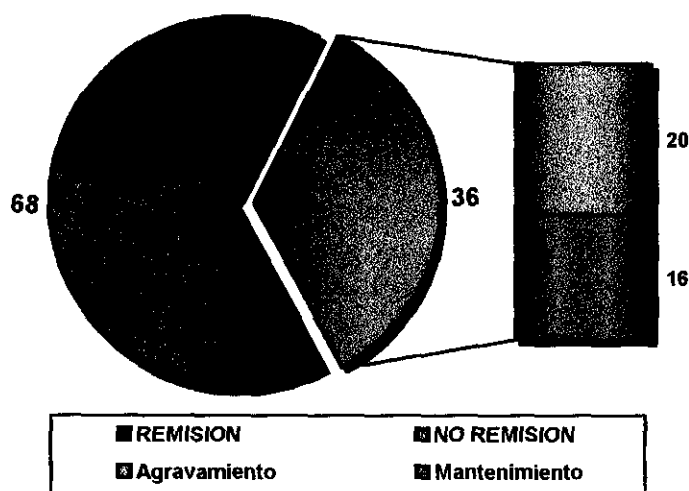
Tabla R.II.D.5 - Distribución de la respuesta a corto plazo en función del sexo, para los distintos tratamientos recibidos (independientemente del empleo de Zyloric®).

R.III - EVOLUCION DE LOS CASOS CLINICOS

En este apartado se describe la evolución de los 104 casos clínicos de nuestro estudio. Lógicamente esta evolución está en concordancia con el tipo de respuesta inicial al tratamiento, que se recoge en el tabla R.II.A.1. Para este análisis las historias clínicas fueron clasificadas en dos grupos dependiendo de que, en su evolución a medio plazo, se hubiera alcanzado o no la remisión. Los criterios que definen la consecución de la remisión han sido previamente descritos en el capítulo dedicado a materiales y métodos.

Dentro del conjunto de animales que no alcanzó la remisión diferenciamos dos subgrupos: aquellos que presentaron una evolución hacia el agravamiento y los que evolucionaron hacia un mantenimiento del proceso (figura R.III.a).

Fig R.III.a - DISTRIBUCION SEGÚN LA EVOLUCION DE LOS CASOS
n = 104



R.III.A -. EVOLUCION HACIA LA NO REMISION

Aunque nuestro estudio se ha centrado principalmente en los casos que alcanzaron la remisión, consideramos obligado presentar la evolución de los perros incluidos en este apartado. Sin embargo y debido a la gran heterogeneidad existente entre los casos y al reducido número de éstos, ha resultado imposible agruparlos para su caracterización y análisis estadístico. Hemos querido, al menos, describir brevemente la progresión de estos animales.

R.III.A.1.- EVOLUCION HACIA EL AGRAVAMIENTO

Este grupo está constituido por un total de 20 perros (el 19.23% de los casos estudiados) que murieron o fueron sacrificados durante el primer ciclo de tratamiento. Todos estos animales, excepto uno que presentó una respuesta terapéutica nula, se corresponden con aquellos que mostraron una respuesta a corto plazo desfavorable.

De estos veinte perros, 12 fueron tratados con la pauta terapéutica G1/G1+Z. Uno de ellos, diagnosticado en fase inicial, murió a causa de un proceso respiratorio concurrente que consideramos no atribuible ni al tratamiento ni a la propia leishmaniosis. Cuatro que se hallaban en fase de estado, con una afección renal (dos) o hepática (uno) moderadas o con un cuadro de diátesis hemorrágica (uno), empeoraron tras la instauración del tratamiento, lo que determinó su sacrificio a los pocos días de iniciada la terapia. Los otros siete casos, en fases avanzadas, con insuficiencia renal (cinco) o hepática (dos) graves, murieron o se sacrificaron antes de finalizar el primer ciclo de tratamiento.

Los 8 perros restantes fueron sometidos a un protocolo de tratamiento del tipo G2/G2+Z. Dos, en fase de estado, fueron sacrificados hacia la mitad del tratamiento a petición de los propietarios, como consecuencia de un mantenimiento del estado general (respuesta nula) en uno de ellos y del desarrollo de una insuficiencia renal en el otro. Seis casos diagnosticados en fases avanzadas, debieron ser sacrificados ya que cinco de ellos presentaban una insuficiencia renal que se agravó con la terapia y el sexto presentaba un notable estado de anemia asociada a una hemorragia nasal profusa que no remitió con el tratamiento.

La tabla R.III.A.1.1 resume las características de la población que integra los perros que murieron o fueron sacrificados y permite apreciar, claramente, cómo la mayor parte de ellos se encontraban en fases avanzadas de la enfermedad, en el momento del diagnóstico, y presentaron una respuesta terapéutica inicial desfavorable.

TRATAMIENTO	FASE	RESPUESTA MUY FAVORABLE O FAVORABLE <i>n</i>	RESPUESTA NULA <i>n</i>	RESPUESTA DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	FASE I	0	0	1	1
	FASE E	0	0	4	4
	FASE A	0	0	7	7
TOTALES PARCIALES		0	0	12	12
G2/G2+Z	FASE E	0	1	1	2
	FASE A	0	0	6	6
TOTALES	PARCIALES	0	1	7	8
TOTALES		0	1	19	20

Tabla R.III.A.1.1 - Distribución del tipo de respuesta a corto plazo, en los casos con evolución hacia el agravamiento, en función del tratamiento recibido y de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico y tipo de respuesta terapéutica a corto plazo.

R.III.A.2 -. EVOLUCION HACIA EL MANTENIMIENTO

En esta categoría se incluyen los casos que, tras la instauración del tratamiento, presentaron periodos de cierta mejoría y/o deterioro, pero ni llegaron a alcanzar la remisión clínica ni tampoco sufrieron un drástico empeoramiento del proceso. Este grupo, constituido por 16 animales (15.38% del total), está integrado por 8 casos cuya respuesta al tratamiento a corto plazo fue clasificada como nula. Los otros 8 perros aquí incluidos presentaron, inicialmente, una respuesta favorable pero no llegaron a cumplir los requisitos que definen la remisión, en ningún momento, durante el tiempo que fueron controlados.

Diez de estos casos fueron tratados con el protocolo G1/G1+Z. Todos, excepto uno diagnosticado en fase inicial, se hallaban en fase de estado en el momento de iniciar la terapia. Asimismo, todos ellos, a excepción de uno que recibió cuatro ciclos, fueron sometidos a un sólo ciclo de tratamiento durante el tiempo de seguimiento.

Los seis casos restantes de este grupo fueron tratados con el protocolo G2/G2+Z y diagnosticados en fase de estado de la enfermedad. Cuatro de ellos recibieron un sólo ciclo mientras que, a los otros dos, se les administraron dos ciclos de tratamiento durante el tiempo de seguimiento que, como se recoge en la tabla R.III.A.2.1 y, al igual que para la pauta G1/G1+Z, fue variable para los distintos casos.

SEGUIMIENTO / TRATAMIENTO	3 MESES <i>n</i>	3-6 MESES <i>n</i>	6-12 MESES <i>n</i>	>12 MESES <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	2	3	4	1	10
G2/G2+Z	1	3	1	1	6

TABLA R.III.A.2.1 - Distribución del tiempo de seguimiento, en los casos que evolucionaron hacia el mantenimiento del cuadro, en función del tratamiento recibido.

La tabla R.III.A.2.2 resume las características de la población que no llegó a alcanzar la remisión ni presentó un drástico empeoramiento durante el periodo de seguimiento. Apreciamos cómo la mayor parte de los casos se encontraban en fases de estado de la enfermedad en el momento del diagnóstico y presentaron una respuesta terapéutica inicial favorable o nula.

TRATAMIENTO	FASE	RESPUESTA MUY FAVORABLE <i>n</i>	RESPUESTA FAVORABLE <i>n</i>	RESPUESTA NULA <i>n</i>	RESPUESTA DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	FASE I	0	0	1	0	1
	FASE E	0	6	3	0	9
TOTALES PARCIALES		0	6	4	0	10
G2/G2+Z	FASE E	0	2	4	0	6
TOTALES		0	8	8	0	16

Tabla R.III.A.2.2 - Distribución del tipo de respuesta a corto plazo, en los casos con evolución hacia el mantenimiento, en función del tratamiento recibido y de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

R.III.B -. EVOLUCION HACIA LA REMISION

Un total de 68 casos (65.38% del global) alcanzaron la remisión clínica y biopatológica, tras la instauración del tratamiento, en algún momento del seguimiento. Estos casos se corresponden con aquellos perros cuya respuesta a corto plazo fue favorable o muy favorable.

La tabla R.III.B.1 resume las características de esta población y permite apreciar una mayor proporción de respuesta terapéutica a corto plazo muy favorable en los casos diagnosticados en fases iniciales de la enfermedad y/o tratados con el protocolo de dosis diarias altas de Glucantime® (G1/G1+Z).

TRATAMIENTO	FASE	RESPUESTA MUY FAVORABLE <i>n</i>	RESPUESTA FAVORABLE <i>n</i>	RESPUESTA NULA O DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	FASE I	19	1	0	20
	FASE E	24	2	0	26
	FASE A	1	1	0	2
TOTALES PARCIALES		44	4	0	48
G2/G2+Z	FASE I	6	2	0	8
	FASE E	4	8	0	12
TOTALES PARCIALES		10	10	0	20
TOTALES		54	14	0	68

Tabla R.III.B.1 - Distribución del tipo de respuesta, en los casos con evolución hacia la remisión, en función del tratamiento recibido y de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

Del total de los casos que presentaron remisión 14 fueron tratados con el protocolo G1, 34 con G1+Z, 11 con G2 y 9 con G2+Z. En algunos de estos animales, tal y como se indicó en materiales y métodos, fue preciso administrar más de un ciclo de tratamiento hasta conseguir la remisión. En primer lugar, quisimos comprobar, mediante el test de χ^2 , si el hecho de que se alcanzara o no la remisión era independiente de la administración de alopurinol (tabla R.III.B.2).

EVOLUCION A MEDIO PLAZO / TRATAMIENTO	REMISION SI <i>n</i> (%)	REMISION NO <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>	TEST DE χ^2
G1	14 (63.6)	8	22	$\chi^2 = 0.106$ g.l.:1 $p = 0.7507$
G1+Z	34 (70.8)	14	48	
G2	11 (55.0)	9	20	$\chi^2 = 0.035$ g.l.:1 $p = 0.8601$
G2+Z	9 (64.3)	5	14	
TOTALES	68 (65.4)	36	104	

Tabla R.III.B.2 – Distribución y comparación del tipo de evolución a medio plazo (remisión sí o no) en función del tratamiento recibido (según el empleo o no de Zyloric®).

La ausencia de diferencias significativas entre el empleo o no de Zyloric® nos permite, al igual que ocurría en la respuesta a corto plazo, trabajar agrupando los protocolos de tratamiento en dos grupos: G1/G1+Z y G2/G2+Z. A continuación comprobamos que la consecución de la remisión era, asimismo, independiente de la dosis diaria de Glucantime® administrada ($p = 0.4512$), observándose unas tasas de remisión global en torno al 65% (68/104) (tabla R.III.B.3).

EVOLUCION A MEDIO PLAZO / TRATAMIENTO	REMISION SI <i>n</i> (%)	REMISION NO <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z	48 (68.57)	22	70
G2/G2+Z	20 (58.82)	14	34
TOTALES	68 (65.44)	36	104

$\chi^2 = 0.578$ g.l.: 1 $p = 0.4512$

Tabla R.III.B.3 – Distribución y comparación del tipo de respuesta a medio plazo (remisión sí o no), en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®).

No obstante, el análisis de estas 68 historias clínicas demuestra que el número de ciclos administrados hasta alcanzar la remisión fue variable según la posología de Glucantime® empleada (G1/G1+Z o G2/G-2+Z) (tabla R.III.B.4).

Nº CICLOS / TRATAMIENTO	1 CICLO <i>n</i>	2 CICLOS <i>n</i>	3 CICLOS <i>n</i>	> 3 CICLOS <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>	CICLOS <i>m</i> ± <i>σ</i>
G1/G1+Z	33	15	0	0	48	1.31±0.47
G2/G2+Z	7	6	3	4	20	2.30±1.34
TOTAL	40	21	3	4	68	1.60±0.93

$\chi^2 = 19.541$ g.l.:3 $p = 0.0064$

Tabla R.III.B.4 - Distribución y comparación del número de ciclos administrados hasta la remisión en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®).

De estos 68 casos que presentaron la remisión clínica, 28 fueron perros diagnosticados en fases iniciales, 38 en fases de estado y 2 en fases avanzadas de la enfermedad, observándose una diferencia significativa entre las tasas de remisión en función de dicha variable (tabla R.III.B.5).

REMISION / FASE	REMISION SI <i>n</i> (%)	REMISION NO <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I	28 (93.3)	2	30
FASE E	38 (64.4)	21	59
FASE A	2 (13.3)	13	15
TOTAL	68 (65.4)	36	104

$\chi^2 = 28.3347$ g.l.: 2 $p = 7.036E-07$

Tabla R.III.B.5 – Distribución del tipo de respuesta a medio plazo (remisión sí o no) en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

De igual forma, comprobamos cómo la fase de la enfermedad en que se instauró el tratamiento, independientemente de la dosis de Glucantime® empleada, se asoció significativamente con el número de ciclos administrados para alcanzar la remisión (tabla R.III.B.6).

Nº CICLOS / FASE	1 CICLO <i>n</i>	2 CICLOS <i>n</i>	3 CICLOS <i>n</i>	> 3 CICLOS <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>	CICLOS <i>m±σ</i>
FASE I	25	2	1	0	28	1.14±0.45
FASE E	15	17	2	4	38	1.92±1.07
FASE A	0	2	0	0	2	2
TOTAL	40	21	3	4	68	1.60±0.93
$\chi^2 = 21.9309$ g.l.:6 $p = 0.012$						

Tabla R.III.B.6 – Distribución y comparación del número de ciclos administrados hasta la remisión en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

Por el contrario, se comprobó que ni la edad de los animales en el momento del diagnóstico ni el sexo influían de una forma estadísticamente significativa ni en el hecho de que se llegara o no a la remisión, ni en el número de ciclos que se administraron hasta alcanzar la misma (datos no presentados).

Por otra parte, quisimos averiguar qué resultados se obtenían si consideráramos la fase y el tipo de tratamiento conjuntamente. Para ello, calculamos las medias del número de ciclos recibidos hasta la remisión para cada fase y tipo de tratamiento y las comparamos entre sí (tabla R.III.B.7). La fase avanzada fue eliminada de este estudio estadístico debido al reducido número de casos.

TRATAMIENTO	CICLOS (FASE I)	CICLOS (FASE E)
G1/G1+Z	$m = 1.05$ $\sigma = 0.224$ $n = 20$	$m = 1.4615$ $\sigma = 0.508$ $n = 26$
G2/G2+Z	$m = 1.375$ $\sigma = 0.744$ $n = 8$	$m = 2.9167$ $\sigma = 1.311$ $n = 12$

Tabla R.III.B.7 - Media de ciclos administrados hasta la remisión en función de la fase de la enfermedad y del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®).

FASE I G1/G1+Z			
$d=0.4115$ $t=3.373$ $g.l.:44$ $p=0.002$	FASE E G1/G1+Z		
$d=0.3250$ $t=1.803$ $g.l.:26$ $p=0.083$	$d=0.0865$ $t=0.377$ $g.l.:32$ $p=0.709$	FASE I G2/G2+Z	
$d=1.8667$ $t=6.283$ $g.l.:30$ $p<0.001$	$d=1.4552$ $t=4.968$ $g.l.:36$ $p=0.001$	$d=1.5417$ $t=3.002$ $g.l.:18$ $p=0.008$	FASE E G2/G2+Z

Tabla R.III.B.8 - Comparación de las medias de ciclos administrados hasta la remisión en función de la fase de la enfermedad y del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®).

Al comparar la media de ciclos aplicados, para cada una de las fases de la enfermedad y dentro de cada protocolo terapéutico, comprobamos que ésta es significativamente mayor para la fase de estado que para la inicial. De igual forma, se aprecian diferencias significativas, dentro de la población diagnosticada en fase de estado, cuando se comparan los dos protocolos terapéuticos considerados. Por el contrario, las diferencias observadas en cuanto a la media de ciclos administrados, dentro del grupo de animales en fase inicial, en función del tratamiento recibido pueden ser atribuidas al azar (tablas R.III.B.7 y R.III.B.8).

R.IV- EVOLUCION DE LOS CASOS QUE REMITIERON

Para ampliar nuestro estudio retrospectivo, quisimos conocer la evolución a más largo plazo del grupo de perros que alcanzó la remisión. Lógicamente, este estudio se ve influido por el tiempo de seguimiento de cada caso y los resultados podrían ser considerados como imprecisos, dado que no se conoce por igual el futuro de cada animal. No obstante, pensamos que sería interesante realizar un estudio descriptivo de los datos que pudimos recopilar y, a partir de ellos, intentar extraer ciertas estimaciones que reflejen el porvenir de los perros leishmaniósicos que, siendo sometidos a una terapia específica, responden favorablemente a ella.

R.IV.A -. RECIDIVAS.

Los 68 casos del presente estudio (con remisión) fueron controlados periódicamente durante un mayor o menor intervalo de tiempo, como así consta en su historial. Analizando estas historias pudimos averiguar en cuántos de estos perros se presentó una recidiva. Para determinar los intervalos de tiempo hasta la presentación de dichas recidivas se consideró el tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico. El criterio que se estableció para considerar la existencia de una recidiva quedó expuesto en el capítulo de materiales y métodos.

De los animales que alcanzaron la remisión, 29 (42.65%) presentaron una recidiva, mientras que los 39 (57.35%) restantes permanecieron en remisión durante todo el periodo de seguimiento.

La distribución de las frecuencias relativas y absolutas de presentación de recidiva, según el tipo de tratamiento y la fase de la enfermedad quedan reflejados en la tabla R.IV.A.2. Los tiempos mínimos, máximos y medios de aparición de la recidiva, para estos mismos grupos, se recogen en la tabla R.IV.A.3.

Previamente a la confección de esta distribución y con el fin de poder agrupar los distintos protocolos de tratamiento, de la misma forma que en los apartados anteriores, fue necesaria la confirmación de la ausencia de influencia del empleo de alopurinol en el porcentaje de presentación de recidivas, como así se refleja en la tabla R.IV.A.1.

EVOLUCION A LARGO PLAZO/ TRATAMIENTO	RECIDIVA SI <i>n (%)</i>	RECIDIVA NO <i>n (%)</i>	TOTAL <i>n</i>	TEST DE χ^2
G1	6 (42.9)	8 (57.1)	14	$\chi^2 = 0.058$ g.l.:1 $p = 0.8136$
G1+Z	15 (44.1)	19 (55.9)	34	
G2	6 (54.5)	5 (45.5)	11	$\chi^2 = 1.019$ g.l.:1 $p = 0.3152$
G2+Z	2 (22.2)	7 (77.8)	9	
TOTAL	29 (42.6)	39 (57.4)	68	

Tabla R.IV.A.1 – Distribución y comparación del tipo de evolución a largo plazo (recidiva sí o no) en función del tratamiento recibido (según el empleo o no de Zyloric®).

TRATAMIENTO	FASE ENFERMEDAD	REMISION <i>n</i>	RECIDIVA <i>n</i>	TASA DE RECIDIVA <i>% ± sp</i>
G1/G1+Z	FASE I	20	5	25.0±9.68
	FASE E	26	15	57.69±9.69
	FASE A	2	1	50.0±35.35
TOTALES	PARCIALES	48	21	43.75±7.16
G2/G2+Z	FASE I	8	3	37.5±17.12
	FASE E	12	5	41.67±14.23
TOTALES	PARCIALES	20	8	40.0±10.45
TOTAL		68	29	42.65±6.00

Tabla R.IV.A.2 – Tasas de recidiva en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®) y de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

TRATAMIENTO	FASE ENFERMEDAD	RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MIN y MAX DE RECIDIVA <i>meses</i>	TIEMPO DE RECIDIVA <i>m ± sm (meses)</i>
G1/G1+Z	FASE I	5	7 21	15.6±2.34 $\sigma = 5.22$
	FASE E	15	5 25	12.0±1.59 $\sigma = 6.18$
	FASE A	1	27	27.0
TOTALES	PARCIALES	21	5 27	13.57±1.44 $\sigma = 6.64$
G2/G2+Z	FASE I	3	5 24	14.33±5.49 $\sigma = 9.50$
	FASE E	5	9 22	13.4±2.29 $\sigma = 5.13$
TOTALES	PARCIALES	8	5 24	13.75±2.26 $\sigma = 6.41$
TOTALES		29	5 27	13.62±1.20 $\sigma = 6.46$

Tabla R.IV.A.3 - Distribución de los tiempos mínimos, máximos y medios de recidiva en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®) y de la fase de enfermedad en el momento del diagnóstico.

La proporción de recidivas se mostró independiente ($p=0.9874$) del tratamiento utilizado para alcanzar la remisión (R.IV.A.5). Aunque estadísticamente se demostró, asimismo, la ausencia de asociación entre la tasa de recidiva y la fase de la enfermedad, considerando las tres fases de la enfermedad ($p=0.1558$), las diferencias llegaron a ser casi significativas cuando se prescindió de la fase avanzada y se compararon los porcentajes de recidiva obtenidos para las fases inicial y de estado de la enfermedad ($p=0.0915$) (tablas R.IV.A.4).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / FASE	REMISION <i>n</i>	RECIDIVA SI <i>n</i> (%)	RECIDIVA NO <i>n</i> (%)	
FASE I	28	8 (28.6)	20 (71.4)	$\chi^2 = 2.899$ g.l.: 1 $p = 0.0915$
FASE E	38	20 (52.6)	18 (47.4)	
FASE A	2	1 (50.0)	1 (50.0)	
TOTAL	68	29 (42.65)	39 (57.35)	

$\chi^2 = 3.861$ g.l.: 6 $p = 0.1558$

Tabla R.IV.A.4 – Tasas de recidiva en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	REMISION <i>n</i>	RECIDIVA SI <i>n</i> (%)	RECIDIVA NO <i>n</i> (%)
G1/G1+Z	48	21 (43.7)	27 (56.3)
G2/G2+Z	20	8 (40.0)	12 (60.0)
TOTAL	68	29 (42.65)	39 (57.35)

$\chi^2 = 0.00025$ g.l.: 1 $p = 0.9874$

Tabla R.IV.A.5 – Tasas de recidiva en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®).

En lo que se refiere a los intervalos de tiempo transcurrido hasta la aparición de las recidivas, las diferencias observadas entre tales intervalos no alcanzan valores significativos ni al comparar las dos posologías de Glucantime® administradas ($p=0.9483$), ni al comparar las fases de la enfermedad en el momento en que se instauró la terapia ($p=0.2798$) (tablas R.IV.A.6 y R.IV.A.7). Así, el promedio de tiempo para la presentación de la primera recidiva, considerando la población de este estudio globalmente, pudo ser estimado en 13.62 ± 1.2 meses, con una distribución que se ajusta a una curva normal (tabla R.IV.A.8 y figura R.IV.A.a).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MIN y MAX RECIDIVA <i>meses</i>	TIEMPO RECIDIVA <i>meses</i> <i>m ± s_m</i>
G1/G1+Z	21	5 27	13.57±1.44 $\sigma = 6.64$
G2/G2+Z	8	5 24	13.75±2.26 $\sigma = 6.41$
TOTAL	29	5 27	13.62±1.20 $\sigma = 6.46$

$d = 0.17857$

$t = 0.065323$

g.l.: 27

$p = 0.94839$

Tabla R.IV.A.6 - Tiempos mínimos, máximos y medios de presentación de recidiva en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / FASE	RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MIN y MAX RECIDIVA <i>meses</i>	TIEMPO RECIDIVA <i>meses</i> <i>m ± s_m</i>
FASE I	8	5 24	15.12±2.29 $\sigma = 6.47$
FASE E	20	5 25	12.35±1.30 $\sigma = 5.83$
FASE A	1	27	27
TOTALES	29	5 27	13.62±1.20 $\sigma = 6.46$

$d = 2.775$

$t = 1.1036$

g.l.: 26

$p = 0.27989$

Se compararon las medias de recidiva en fase inicial y fase de estado, quedando excluida la fase avanzada

Tabla R.IV.A.7 - Tiempos mínimos, máximos y medios de presentación de recidiva en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

	<i>m</i>	σ	<i>S_m</i>	mínimo	máximo	<i>n</i>
T. RECIDIVA (meses)	13.6207	6.4609	1.1998	5	27	29
Diferencia máxima teórica:			0.221 ($p < 0.1$)	0.246 ($p < 0.05$)		
Diferencia máxima observada:			0.12619	(NO SIGNIFICATIVO)		
PERCENTILES		2.5% = 5.00		97.5% = 26.55		
		5% = 5.00		95% = 25.10		
		10% = 6.00		90% = 24.00		
		25% = 8.75		75% = 17.25		

Tabla R.IV.A.8 - Conformidad de la distribución del tiempo de recidiva con una curva de Gauss.

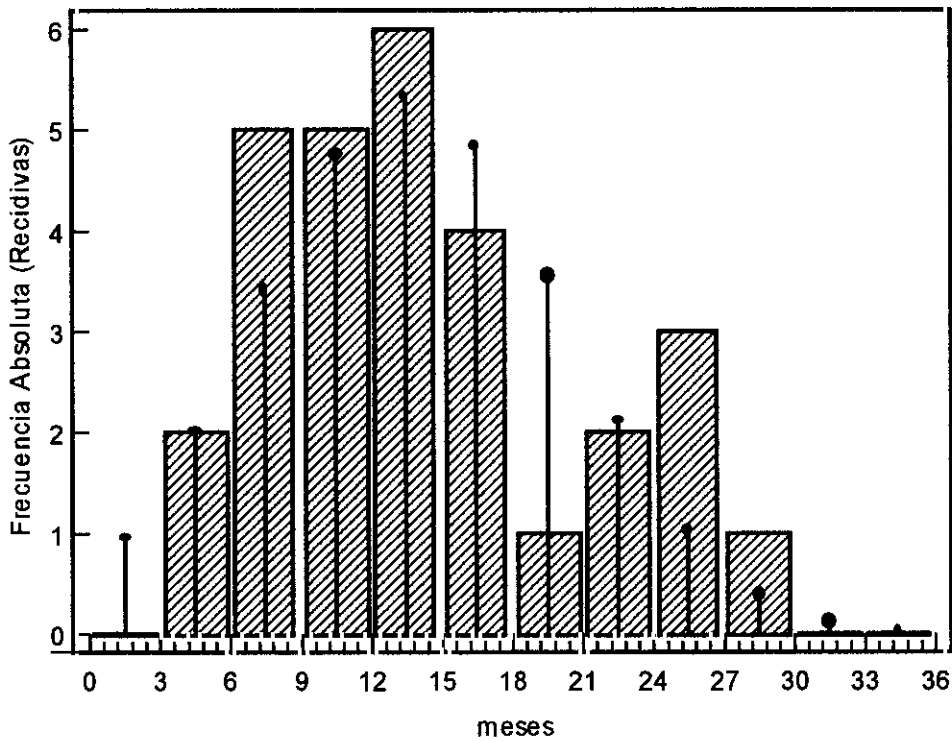


Fig R.IV.A.a – Distribución de los casos en función del tiempo de presentación de recidiva (independientemente del tipo de tratamiento recibido).

Además y a pesar de que el empleo de alopurinol asociado al Glucantime®, según nuestros resultados, no modifica la respuesta terapéutica a corto plazo, ni los porcentajes de remisión, ni las tasas de recidiva en la leishmaniosis canina, quisimos comprobar si, al menos, su utilización provocaba una prolongación en los periodos de tiempo hasta la presentación de las recidivas, de producirse éstas. Para ello se calcularon y compararon, mediante el test de la *t* de Student, los tiempos medios de recidiva para los tratamientos que llevan asociados alopurinol, es decir G1+Z/G2+Z (14.35 ± 7.42 meses), y los que no, G1/G2 (12.58 ± 4.91 meses). A pesar de observarse un mayor tiempo promedio en la presentación de las recidivas a favor de los perros que recibieron Zyloric®, en principio y según nuestros resultados, esta diferencia puede ser atribuida al azar ($p=0.48$). Estos resultados fueron calculados a partir de la tabla R.IV.A.9.

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MIN y MAX DE RECIDIVA <i>meses</i>	TIEMPO RECIDIVA <i>m ± sm meses</i>
G1	6	7 18	13±1.79 $\sigma = 4.38$
G2	6	5 22	12.17±2.36 $\sigma = 5.78$
G1/G2	12	5 22	12.58±1.42 $\sigma = 4.91$
G1+Z	15	5 27	13.8±1.93 $\sigma = 7.48$
G2+Z	2	13 24	18.5±5.50 $\sigma = 7.78$
G1+Z/G2+Z	17	5 27	14.35±1.80 $\sigma = 7.42$
$d = 1.7696$ $t = 0.72016$ $g.l.: 27$ $p = 0.47761$			

Tabla R.IV.A.9 - Distribución de los tiempos mínimos, máximos y medios de recidiva en función del tratamiento recibido. Comparación del tiempo medio de recidiva según el empleo o no de Zyloric®.

R.IV.B -. PERIODOS DE REMISION

Como ya se ha mencionado, 39 (57.35%) de los perros que alcanzaron la remisión no presentaron recidiva durante todo el periodo de seguimiento (que fue variable para los distintos casos). A la hora de precisar los intervalos de permanencia en remisión se consideró, al igual que para las recidivas, el tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico. Las frecuencias relativas y absolutas, así como los tiempos medios, mínimos y máximos de seguimiento de los casos que no presentaron recidivas, en función de la terapia y de la fase de la enfermedad, quedan reflejados en las tablas R.IV.B.1 y R.IV.B.2.

TRATAMIENTO	FASE	REMISION <i>n</i>	RECIDIVA NO <i>n</i>	CASOS SIN RECIDIVA <i>% ± sp</i>
G1/G1+ Z	FASE I	20	15	75.0±9.68
	FASE E	26	11	42.31±9.69
	FASE A	2	1	50.0±35.36
TOTALES	PARCIALES	48	27	56.25±7.16
G2/G2 + Z	FASE I	8	5	62.5±17.12
	FASE E	12	7	58.33±14.23
TOTALES PARCIALES		20	12	60.0±10.95
TOTALES		68	39	57.35±6.0

Tabla R.IV.B.1 – Tasas de permanencia en remisión, durante el tiempo de seguimiento, en función del tratamiento recibido y de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

TRATAMIENTO	FASE	SIN RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MIN y MAX DE SEGUIMIENTO <i>meses</i>	TIEMPO SEGUIMIENTO <i>m ± Sm (meses)</i>
G-1/G-1+A	FASE I	15	3 43	18.67±3.80 $\sigma = 14.73$
	FASE E	11	3 68	21.0±6.55 $\sigma = 21.74$
	FASE A	1	8	8.0
TOTALES PARCIALES		27	3 68	19.22±3.36 $\sigma = 17.46$
G-2/G-2+A	FASE I	5	3 37	16.2±6.92 $\sigma = 15.48$
	FASE E	7	3 29	11.43±4.33 $\sigma = 11.46$
TOTALES PARCIALES		12	3 37	13.42±3.71 $\sigma = 12.84$
TOTALES		39	3 68	17.43±2.60 $\sigma = 16.24$

Tabla R.IV.B.2 - Distribución de los tiempos mínimos, máximos y medios de permanencia en remisión en función del tratamiento recibido y de la fase de la enfermedad en el momento de diagnóstico.

Lógicamente el estudio estadístico de la distribución de los casos que se mantuvieron en remisión, en función de la fase de la enfermedad y en función del tratamiento recibido, reveló resultados en concordancia con los anteriormente citados para las recidivas (tablas R.IV.A.4 y R.IV.A.5). En este caso, el porcentaje de perros que permaneció en remisión fue casi significativamente mayor para aquellos en fase inicial que para los diagnosticados en fase de estado ($p=0.0915$), independientemente del protocolo terapéutico utilizado ($p=0.9874$).

Aunque los periodos de supervisión fueron diferentes entre los distintos casos, en función de la disponibilidad de los propietarios, quisimos profundizar en el estudio del tiempo de presentación de recidiva y de permanencia en remisión para cada grupo de tratamiento (G1/G1+Z y G2/G2+Z). Para ello, se utilizó la metodología estadística denominada "*análisis de la supervivencia*" (subprograma BMDP1L).

El método Kaplan-Meier, incluido en este subprograma, nos permitió estimar la curva de supervivencia (entendiendo ésta como permanencia en remisión) para cada grupo terapéutico, a partir del cálculo de las tasas de supervivencia condicional (proporción de casos que permanecen en remisión en un intervalo de tiempo determinado) y de las tasas de supervivencia acumulada (proporción de casos que permanecen en remisión durante un tiempo de seguimiento, considerado desde el momento inicial). La figura R.IV.B.a recoge los resultados de este estudio.

Tasas de Supervivencia (Permanencia en Remisión) Acumulativa (error estandar)						
MESES	GRUPO G1/G1+Z		GRUPO G2/G2+Z			
3	-	-	-	-	20	-
4	-	-	-	-	21	0.465 (0.094)
5	0.976	(0.023)	0.937	(0.059)	22	-
6	0.925	(0.041)	-	-	23	0.434 (0.133)
7	0.872	(0.053)	-	-	24	0.423 (0.097)
8	0.846	(0.058)	-	-	25	0.381 (0.095)
9	0.817	(0.064)	0.859	(0.093)	27	0.338 (0.092)
10	0.761	(0.069)	0.781	(0.110)	28	-
12	0.702	(0.075)	-	-	29	-
13	0.672	(0.080)	0.608	(0.127)	32	-
14	-	-	0.521	(0.136)	33	-
15	-	-	-	-	34	-
16	0.571	(0.084)	-	-	37	-
17	0.538	(0.089)	-	-	43	-
18	0.504	(0.089)	-	-	68	-

Test de Comparación de Curvas de Supervivencia		
Mantel-Cox	$p=0.9945$	Tarone-Ware $p=0.9902$
		Breslow $p=1.0000$

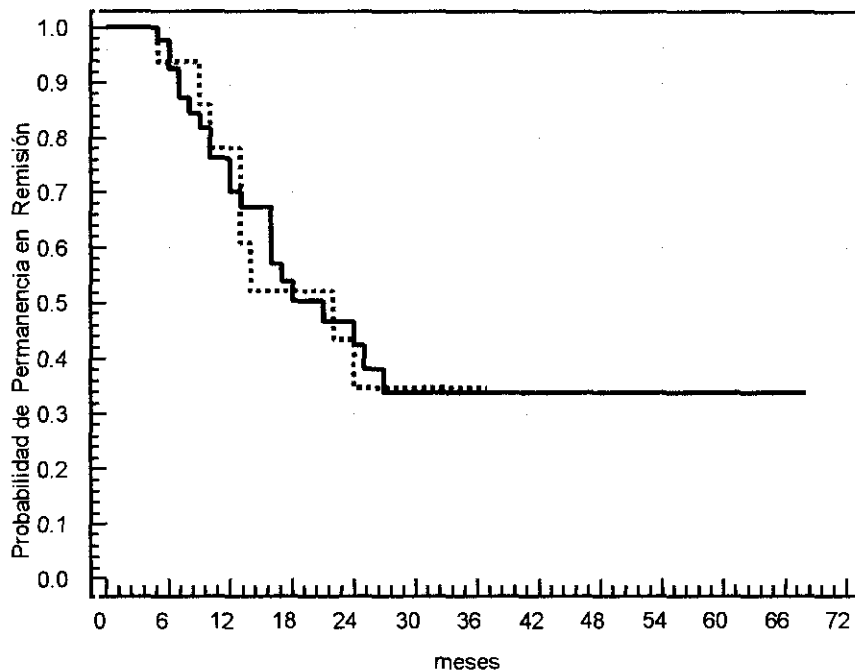


Fig R.IV.B.a – Estudio de supervivencia (permanencia en remisión) para los tratamientos G1/G1+Z (línea continua) y G2/G2+Z (línea discontinua).

La ausencia de diferencias significativas entre estas dos distribuciones hizo posible agrupar los casos con independencia del tratamiento recibido y estimar, así, una curva de supervivencia (o de permanencia en remisión) global (figura R.IV.B.b).

Tasas de Supervivencia (Permanencia en Remisión) Acumulativa (error estandar)					
MESES	GRUPOS G1/G1+Z y G2/G2+Z		MESES	GRUPOS G1/G1+Z y G2/G2+Z	
3	-	-	20	-	-
4	-	-	21	0.483	(0.080)
5	0.966	(0.024)	22	0.456	(0.079)
6	0.928	(0.035)	23	-	-
7	0.889	(0.043)	24	0.399	(0.077)
8	0.870	(0.046)	25	0.371	(0.079)
9	0.828	(0.053)	27	0.342	(0.077)
10	0.766	(0.059)	28	-	-
12	0.722	(0.064)	29	-	-
13	0.655	(0.068)	32	-	-
14	0.631	(0.072)	33	-	-
15	-	-	34	-	-
16	0.558	(0.073)	37	-	-
17	0.534	(0.076)	43	-	-
18	0.510	(0.076)	68	-	-

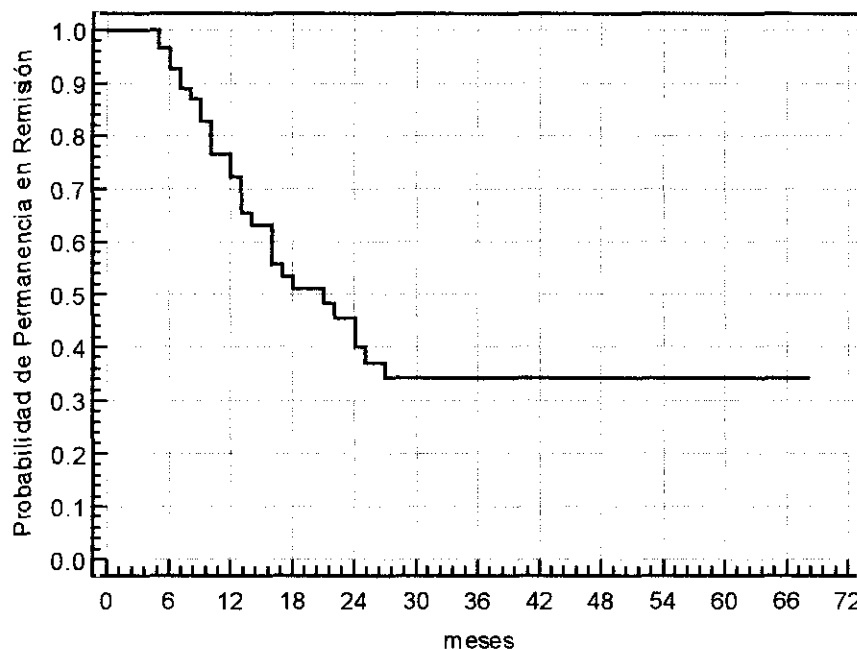


Fig R.IV.B.b – Estudio de supervivencia (permanencia en remisión) para los tratamientos G1/G1+Z y G2/G2+Z conjuntamente.

Según los resultados obtenidos se observa cómo más del 90% de los casos permanecen libres de recidiva durante los seis primeros meses post-tratamiento. Las tasas acumulativas de permanencia en remisión descienden con el paso del tiempo hasta situarse en el 72.2% y 39.9% al año y a los dos años de seguimiento, respectivamente, tras la instauración de la terapia.

R.IV.C -. EVOLUCION DE LOS CASOS QUE PRESENTARON RECIDIVA

Los distintos criterios y decisiones que se iban adoptando con cada uno de los casos incluidos bajo este epígrafe haría necesaria la descripción de, prácticamente, cada uno de ellos por separado. Sin embargo, trataremos de resumir brevemente la evolución de los perros integrados en esta población, agrupándolos según el tipo de tratamiento recibido tras sufrir la recidiva.

De los 29 casos que, tras alcanzar una remisión clínica, presentaron una primera recidiva del proceso ocho no volvieron a ser tratados. De éstos, cuatro fueron sacrificados y los otros cuatro mantuvieron el cuadro, sin llegar a alcanzar una segunda remisión durante el tiempo de seguimiento (entre 3 y 9 meses).

Los otros 21 casos fueron sometidos a una nueva terapia específica, siguiendo distintas pautas. Diecisiete de ellos se sometieron a un ciclo de tratamiento según el protocolo G1/G1+Z alcanzándose, en 15 de ellos, la remisión clínica al finalizar el mismo mientras que, de los otros dos, uno se mantuvo sin remisión durante 6 meses y el otro desarrolló una insuficiencia renal durante la terapia que determinó su sacrificio.

Ocho de los 15 casos que alcanzaron esta segunda remisión, tras la administración de G1/G1+Z en la primera recidiva, permanecieron estabilizados durante el tiempo que fueron controlados (entre 5 y 63 meses). Los otros siete casos presentaron una segunda recidiva.

Los cuatro perros restantes fueron sometidos a terapia tras la primera recidiva con el protocolo G2/G2+Z, consiguiéndose la segunda remisión en todos estos perros, tras 1 ciclo de tratamiento en uno de los casos, 5 ciclos en otro y 2 ciclos en los dos casos restantes. Durante el tiempo de seguimiento, dos de estos cuatro casos sufrieron una nueva recidiva.

La respuesta de los 21 casos que fueron sometidos a terapia tras la primera recidiva, en función del tipo de tratamiento recibido, queda recogida en la siguiente tabla (tabla R.IV.C.1):

RESPUESTA TRAS 1ª RECIDIVA/ TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE n	FAVORABLE n	NULA n	DESFAVORABLE n	TOTAL n
G1/G1+Z	15	0	1	1	17
G2/G2+Z	0	4	0	0	4
TOTAL	15	4	1	1	21

Tabla R.IV.C.1 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®), tras la primera recidiva.

De estos 21 casos, 19 presentaron una respuesta favorable o muy favorable al tratamiento y fueron precisamente los que llegaron a alcanzar una segunda remisión (tabla R.IV.C.2).

EVOLUCION A MEDIO PLAZO / TRATAMIENTO (TRAS 1ª RECIDIVA)	2ª REMISION SI <i>n</i>	2ª REMISION NO <i>n</i>	TASAS DE 2ª REMISION %	CICLOS <i>m±σ</i>
G1/G1+Z	15	2	88,23	1
G2/G2+Z	4	0	100	2.5±1.5
TOTAL	19	2	90.48	

Tabla R.IV.C.2 – Distribución de la evolución a medio plazo (2ª remisión sí o no), tasas de 2ª remisión y media de ciclos hasta la 2ª remisión, en los casos que presentaron 1ª recidiva, en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®).

La tasa global de 2ª remisión (19/21) fue significativamente mayor que la tasa global de remisión observada tras la instauración del primer tratamiento (68/104) (tabla R.IV.C.3), pudiéndose considerar similar a esta última cuando limitamos la población al grupo diagnosticado en fase inicial de la enfermedad (28/30) (tabla R.IV.C.4).

EVOLUCION A MEDIO PLAZO / TRATAMIENTO	REMISION SI <i>n</i>	REMISION NO <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
TRAS DIAGNOSTICO	68	36	104
TRAS 1ª RECIDIVA	19	2	21

$\chi^2: 4.0807$ *g.l.*: 1 *p* = 0.04338

Tabla R.IV.C.3 – Distribución y comparación de la evolución a medio plazo (remisión sí o no), en los casos que recibieron tratamiento tras el diagnóstico y tras la 1ª recidiva.

EVOLUCION A MEDIO PLAZO / TRATAMIENTO	REMISION SI <i>n</i>	REMISION NO <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
TRAS DIAGNOSTICO/ F.INICIAL	28	2	30
TRAS 1ª RECIDIVA	19	2	21

$\chi^2: 0.0242$ *g.l.*: 1 *p* = 0.87632

Tabla R.IV.C.4 – Distribución y comparación de la evolución a medio plazo (remisión sí o no), en los casos que recibieron tratamiento tras el diagnóstico en fase inicial y tras la 1ª recidiva.

La evolución posterior de los 19 casos con remisión tras la primera recidiva se resume en la siguiente tabla (tabla R.IV.C.5):

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO (TRAS 1ª RECIDIVA)	SIN 2ª RECIDIVA n (%)	SIN 2ª RECIDIVA TIEMPO MIN y MAX $m \pm \sigma$ meses	2ª RECIDIVA n (%)	2ª RECIDIVA TIEMPO MIN y MAX $m \pm \sigma$ meses
G1/G1+Z	8 (53.3)	5 63 25.25±16.31	7 (46.7)	5 18 10.29±4.10
G2/G2+Z	2 (50.0)	26 27 26.5±0.50	2 (50.0)	9 10 9.5±4.05
TOTAL	10 (52.6)	25.5±14.60	9 (47.4)	10.11±3.63

Tabla R.IV.C.5 - Evolución de los casos que alcanzaron la 2ª remisión tras la 1ª recidiva en función del tratamiento recibido. Distribución de los casos que permanecieron en remisión y de los que sufrieron 2ª recidiva. Tiempos medios, máximos, mínimos y medios en remisión y hasta la 2ª recidiva.

El porcentaje de segundas recidivas fue, según nuestros resultados, del 47.4% (9/19), con un tiempo medio de presentación de 10 meses desde la detección de la primera recidiva. Estos porcentajes e intervalos pueden ser considerados similares a los descritos para las primeras recidivas (tabla R.IV.C.6).

	%	TIEMPO DE PRESENTACION $m \pm \sigma$ meses
1ª RECIDIVA	29/68 (42.65)	13.62±1.20
2ª RECIDIVA	9/19 (47.37)	10.11±3.63
	$\chi^2=0.012$ g.l.: 1 $p=0.9179$	$d=2.51$ $t=1.546$ g.l.: 36 $p=0.1308$

Tabla R.IV.C.6 - Comparación de las tasas y tiempos promedio de presentación de la primera y de la segunda recidiva.

R.V - EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS

Para finalizar nuestro estudio retrospectivo quisimos describir la evolución tanto del título de anticuerpos como del cociente Alb/Glo en los perros que alcanzaron y mantuvieron la remisión (68 casos), estableciéndose un tiempo máximo de seguimiento, en este apartado, de un año. Las curvas que determinan la dinámica de ambos parámetros fueron diseñadas a partir de los controles disponibles de dichos perros, desde el momento del diagnóstico hasta la remisión y durante ésta, a lo largo del tiempo establecido excluyéndose, de aquellos casos que sufrieron recidivas antes de superar el primer año, todos los controles realizados a partir de las mismas.

Estos 68 casos fueron distribuidos en distintos grupos en función del tratamiento recibido y del título de anticuerpos y cociente Alb/Glo que presentaron en el momento del diagnóstico, como se describe en materiales y métodos.

R.V.A -. EVOLUCION DEL TITULO DE ANTICUERPOS

Para calcular la posible ecuación que nos determinara la dinámica de anticuerpos, nuestra colección de datos fue distribuida en 14 grupos atendiendo al tratamiento y título inicial, tal y como se recoge en la tabla R.V.A.1. En dicho cuadro se indica el número de casos y controles serológicos considerados para el estudio de cada grupo.

TRATAMIENTO (GRUPO)	TITULO INICIAL	CASOS <i>n</i>	CONTROLES <i>n</i>
G1/G1+Z (G1-6400)	1/6400	11	53
G1/G1+Z (G1-3200)	1/3200	7	27
G1/G1+Z (G1-1600)	1/1600	5	21
G1/G1+Z (G1-800)	1/800	9	40
G1/G1+Z (G1-400)	1/400	9	34
G1/G1+Z (G1-200)	1/200	4	16
G1/G1+Z (G1-100)	1/100	3	12
G2/G2+Z (G2-6400)	1/6400	0	0
G2/G2+Z (G2-3200)	1/3200	4	25
G2/G2+Z (G2-1600)	1/1600	3	15
G2/G2+Z (G2-800)	1/800	5	25
G2/G2+Z (G2-400)	1/400	2	9
G2/G2+Z (G2-200)	1/200	3	12
G2/G2+Z (G2-100)	1/100	3	11

Tabla V.A.1 - Distribución del número de casos y controles serológicos en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®) y del título específico de anticuerpos en el momento del diagnóstico.

Al revisar los resultados obtenidos observamos que todos los perros incluidos en este estudio (es decir, los que evolucionaron hacia la remisión) presentaron, independientemente del tratamiento utilizado (G1, G1+Z, G2, G2+Z), un descenso progresivo en el título de anticuerpos anti-*Leishmania*. No obstante, destacamos cómo en algunos casos, tras la instauración del tratamiento y previamente a este descenso, se observó una ligera elevación de la tasa de anticuerpos. Esta elevación, detectada en algunos perros antes de finalizar el primer ciclo de tratamiento, fue observada más frecuentemente en los casos con títulos iniciales medios (entre 1/400 y 1/800).

Estos ligeros aumentos inmediatos a la instauración del tratamiento han sido ignorados a la hora de calcular las ecuaciones de las curvas que representan, gráficamente, la dinámica del título de anticuerpos.

Comprobamos, mediante análisis estadístico, que en todos los grupos la relación título de anticuerpos/tiempo podía ser ajustada a distintos modelos de curvas, como lo demostraban los elevados coeficientes de correlación obtenidos para cada una de ellas. De entre las distintas ecuaciones de regresión posibles (lineal: $y=a+bx$, exponencial: $y=a^{bx}$, logarítmica: $y=a+b\ln x$, potencial: $y=ax^b$, hiperbólica: $y=a+b/x$, recíproca: $y=1/(a+bx)$ y racional: $y=x/(b+ax)$), mostramos las que presentaron el coeficiente de correlación más elevado para cada grupo (tabla R. V. A.2).

GRUPO	ECUACION DE LA CURVA	a ± s	b ± s	r
G1-6400	$y = a + b \ln x$	6289.3 ± 162.9	-1085.8 ± 37.8	0.97
G1-3200	$y = a + b \ln x$	3176.4 ± 91.6	-550.7 ± 22.3	0.98
G1-1600	$y = a + b \ln x$	1596.2 ± 57.8	-257.9 ± 13.7	0.97
G1-800	$y = a + b \ln x$	808.3 ± 25.9	-120.9 ± 6.1	0.95
G1-400	$y = a + b \ln x$	398.9 ± 19.1	-55.4 ± 4.6	0.91
G1-200	$y = a + b \ln x$	199.2 ± 9.7	-26.8 ± 2.2	0.96
G1-100	$y = a + b \ln x$	99.5 ± 4.5	-12.7 ± 1.1	0.97
G2-3200	$y = a + bx$	2716.9 ± 203.6	-9.643 ± 1.327	-0.83
G2-1600	$y = a + bx$	1352.8 ± 140.6	-5.002 ± 0.952	-0.82
G2-800	$y = a + bx$	683.4 ± 54.9	-2.219 ± 0.330	-0.81
G2-400	$y = a + bx$	389.4 ± 31.5	-1.057 ± 0.175	-0.92
G2-200	$y = a + bx$	183.4 ± 18.5	-0.819 ± 0.167	-0.84
G2-100	$y = a + bx$	99.7 ± 6.6	-0.46 ± 0.07	-0.90

Tabla R.V.A.2 - Valor de los coeficientes a y b de la ecuación de la cinética de anticuerpos que mostró el mayor coeficiente de correlación (r), para cada grupo considerado (y = título de anticuerpos recíproco; x = días).

Fue precisamente la ecuación logarítmica, la que se ajustó más significativamente en todos los grupos que recibieron el tratamiento G1/G1+Z, independientemente del título inicial (tabla R.V.A.2). En las figuras R.V.A.a y R.V.A.b se recogen los resultados de algunos de estos grupos, incluyendo la curva y ecuación para cada uno de ellos.

En los grupos que recibieron el tratamiento G2/G2+Z la evolución de los títulos de anticuerpos se podía ajustar, igualmente, a distintas curvas, si bien los coeficientes de correlación para la ecuación logarítmica no fueron tan elevados como los obtenidos en los grupos con tratamiento G1/G1+Z. En estos casos la curva que se ajustó más a la dinámica de los títulos de anticuerpos fue la ecuación lineal (tabla R.V.A.2), lo que indica que, en estos casos, el descenso tras la instauración del tratamiento fue menos acentuado tal y como se observa en las figuras R.V.A.a y R.V.A.b.

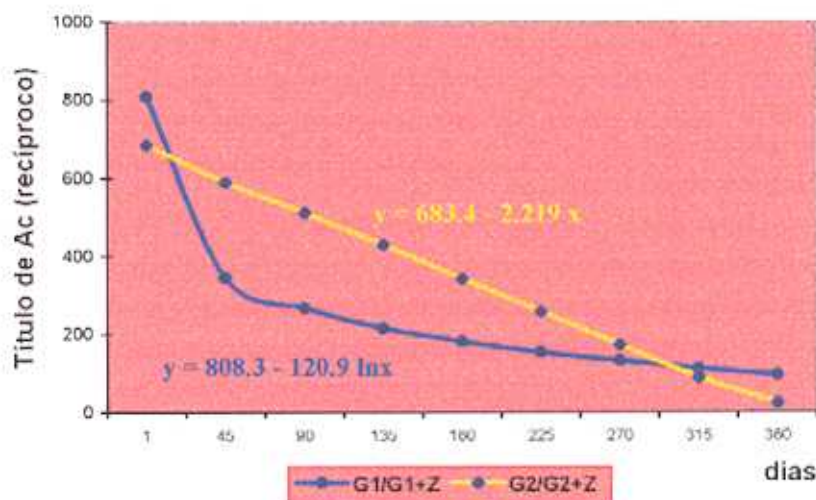


Fig R.V.A.a - Cinética del título de anticuerpos para los grupos G1-800 (tratados con >100-150 mg de antimonioato de meglumine con título inicial=1/800) y G2-800 (tratados con 50-100 mg de antimonioato de meglumine con título inicial=1/800)

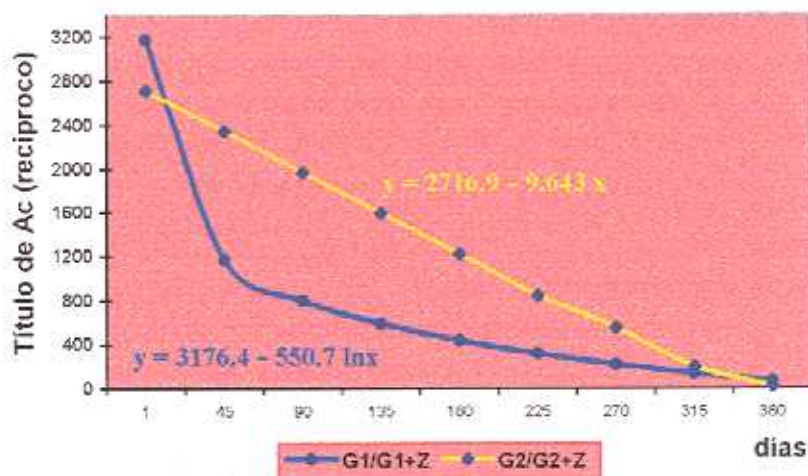


Fig R.V.A.b - Cinética del título de anticuerpos para los grupos G1-3200 (tratados con >100-150 mg de antimonioato de meglumine con título inicial=1/3200) y G2-3200 (tratados con 50-100 mg de antimonioato de meglumine con título inicial=1/3200)

R.V.B - EVOLUCION DEL COCIENTE ALBUMINA/GLOBULINAS

En el estudio de la evolución del cociente Alb/Glo, efectuado a lo largo del tiempo establecido (1 año) en los casos que evolucionaron hacia la remisión, los valores obtenidos en los distintos controles fueron distribuidos, en función del régimen terapéutico recibido y del cociente Alb/Glo en el momento del diagnóstico, en 8 grupos (tabla R.V.B.1).

TRATAMIENTO (GRUPO)	ALB/GLO INICIAL	CASOS <i>n</i>	CONTROLES <i>n</i>
G-1/G-1+Z (G1-0.1)	< 0.20	4	20
G-1/G-1+Z (G1-0.3)	0.2-0.39	16	71
G-1/G-1+Z (G1-0.5)	0.4-0.59	11	47
G-1/G-1+Z (G1-0.7)	0.6-0.79	13	49
G-1/G-1+Z (G1-0.9)	> 0.79	4	16
G-2/G-2+Z (G2-0.1)	< 0.20	0	0
G-2/G-2+Z (G2-0.3)	0.2-0.39	5	37
G-2/G-2+Z (G2-0.5)	0.4-0.59	4	16
G-2/G-2+Z (G2-0.7)	0.6-0.79	6	21
G-2/G-2+Z (G2-0.9)	> 0.79	5	23

Tabla R.V.B.1 - Distribución del número de casos y controles serológicos en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®) y del cociente Alb/Glo en el momento del diagnóstico.

El análisis estadístico demuestra que la evolución del cociente Alb/Glo en todos los grupos de nuestro estudio podría ajustarse, con unos coeficientes de correlación altamente significativos, a una curva de tipo potencial. No obstante, en los grupos sometidos al tratamiento G2/G2+Z, dichos coeficientes son algo menores e, incluso, en alguno de ellos la evolución del cociente Alb/Glo se ajusta más significativamente a una ecuación racional o a una recta (tabla R.V.B.2).

GRUPO	ECUACION DE LA CURVA	<i>a</i> ± <i>s</i>	<i>b</i> ± <i>s</i>	<i>r</i>
G1-0.1	$y = a x^b$	0.173 ± 0.095	0.257 ± 0.022	0.94
G1-0.3	$y = a x^b$	0.277 ± 0.048	0.218 ± 0.011	0.92
G1-0.5	$y = a x^b$	0.474 ± 0.042	0.117 ± 0.010	0.86
G1-0.7	$y = a x^b$	0.688 ± 0.031	0.065 ± 0.007	0.79
G1-0.9	$y = x/(b + ax)$	0.883 ± 0.028	0.082 ± 0.055	0.37
G2-0.3	$y = a + bx$	0.351 ± 0.032	0.002 ± 0.001	0.83
G2-0.5	$y = a x^b$	0.483 ± 0.055	0.124 ± 0.013	0.92
G2-0.7	$y = a x^b$	0.672 ± 0.045	0.077 ± 0.011	0.84
G2-0.9	$y = x/(b + ax)$	0.935 ± 0.023	0.159 ± 0.046	0.61

Tabla R.V.B.2 - Valor de los coeficientes *a* y *b* de la ecuación de la cinética del cociente Alb/Glo que mostró el mayor coeficiente de correlación (*r*), para cada grupo considerado (*y*=cociente Alb/Glo; *x*= días).

Esto sugiere que el grado de respuesta terapéutica mantiene una estrecha relación con el tipo de tratamiento administrado, de manera que los perros tratados con dosis más altas de Glucantime®, recuperan un perfil normal de las proteínas séricas antes que aquellos sometidos a dosis más bajas del antimonial.

Como reflejan nuestros resultados, el tiempo transcurrido hasta alcanzar unos cocientes Alb/Glo normales dependió del valor de dicho cociente en el momento del diagnóstico (antes de iniciarse la terapia). Cuanto más bajos fueron estos valores iniciales mayor fue el tiempo necesario para conseguir su normalización. En cualquier caso, los incrementos más pronunciados se produjeron dentro de los dos primeros meses tras iniciar la terapia. En las figuras R.V.B.a y R.V.B.b se reflejan la curva y la ecuación para algunos de estos grupos.

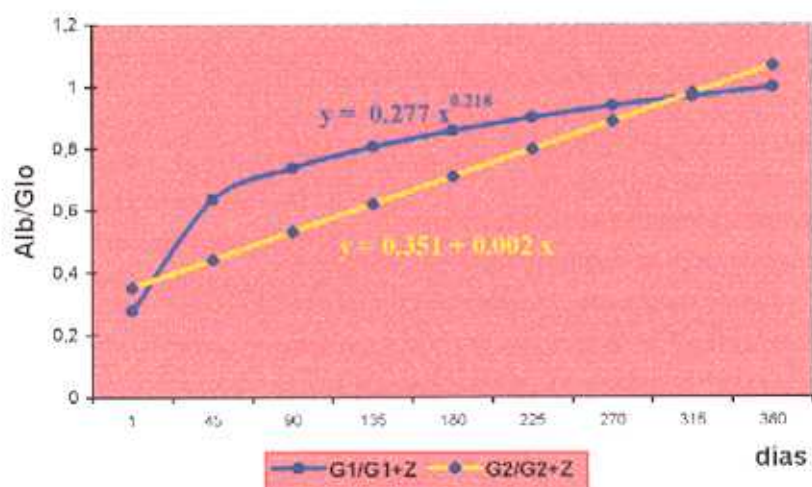


Fig R.V.B.a - Cinética del cociente Alb/Glo para los grupos G1-0.3 (tratados con >100-150 mg de antimonio de meglumine con Alb/Glo inicial=0.2-0.39) y G2-0.3 (tratados con 50-100 mg de antimonio de meglumine con Alb/Glo inicial=0.2-0.39)

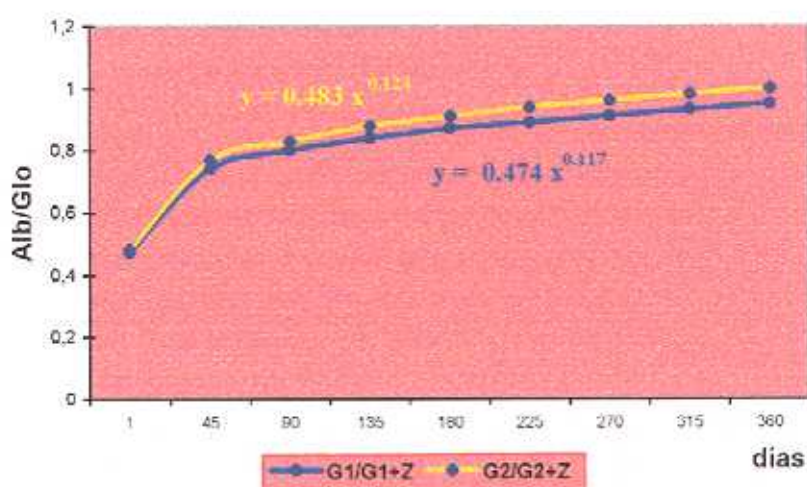


Fig R.V.B.b - Cinética del cociente Alb/Glo para los grupos G1-0.5 (tratados con >100-150 mg de antimonio de meglumine con Alb/Glo inicial=0.4-0.59) y G2-0.5 (tratados con 50-100 mg de antimonio de meglumine con Alb/Glo inicial=0.4-0.59)

ESTUDIO PROSPECTIVO

Dentro de este estudio prospectivo se incluyen 61 perros seleccionados de entre aquellos que fueron atendidos en las consultas de la Facultad de Veterinaria de Madrid y, que tras ser diagnosticados de leishmaniosis, fueron sometidos a un protocolo terapéutico a base de Glucantime®, vía subcutánea, asociado a Zyloric® (G1+Z-SC), tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos.

P.I – DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DE LA MUESTRA

P.I.A-. DESCRIPCION

En este primer apartado se recogen las frecuencias y los resultados de estadística descriptiva de las variables cualitativas y cuantitativas que definen a los 61 casos de este estudio prospectivo, en el momento del diagnóstico.

P.I.A.1-. VARIABLES NOMINALES

- **Distribución según raza, sexo y edad**

Nuestra población integra perros de ambos sexos, de todo tipo de razas y de distintas edades. Los dos sexos se vieron afectados en una proporción prácticamente igual (figura P.I.A.1.b). En la figura P.I.A.1.a queda reflejada la gran diversidad de razas, y dentro de ellas la variedad en tamaño, aptitud y tipo de pelaje. Por tal motivo, esta variable fue eliminada de los estudios estadísticos. En lo que se refiere a la edad, el predominio de los animales adultos (entre 2 y 8 años) sobre los jóvenes y los viejos fue evidente (figura P.I.A.1.c).

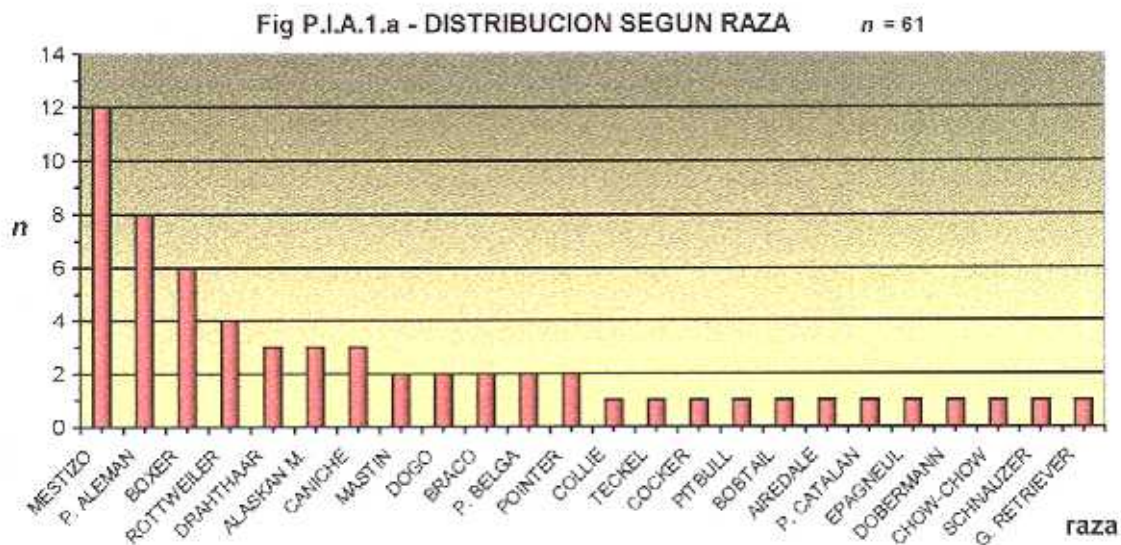


Fig P.I.A.1.b - DISTRIBUCION
SEGUN SEXO

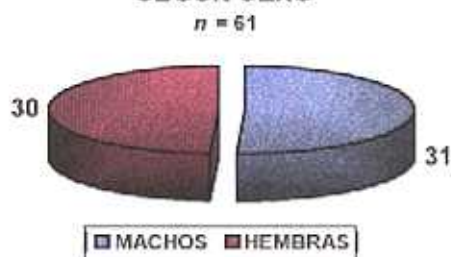
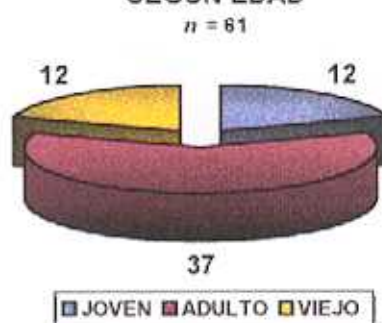


Fig P.I.A.1.c - DISTRIBUCION
SEGUN EDAD



- **Distribución según fase de la enfermedad y cuadro clínico**

La distribución en función de la fase de la enfermedad revela un mayor porcentaje de perros diagnosticados en fase de estado con respecto a la muestra global (figura P.I.A.1.d). Además, la mayoría de los animales presentaban sintomatología en el momento del diagnóstico, con un ligero predominio de los cuadros mixto y visceral sobre el cuadro eminentemente cutáneo (figura P.I.A.1.e). La proporción de casos con insuficiencia renal y, sobre todo, hepática, previa a la instauración del tratamiento, fue baja (figuras P.I.A.1.f e P.I.A.1.g).

Fig P.I.A.1.d - DISTRIBUCION
SEGUN FASE

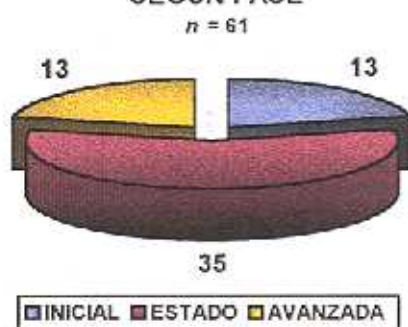


Fig P.I.A.1.e - DISTRIBUCION
SEGUN CUADRO CLINICO



Fig P.I.A.1.f - DISTRIBUCION SEGÚN PRESENCIA O NO DE INSUFICIENCIA RENAL

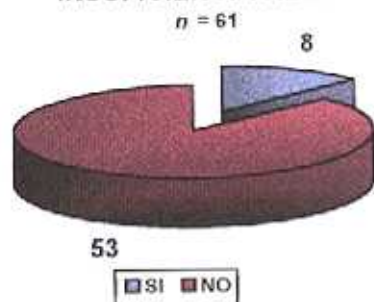
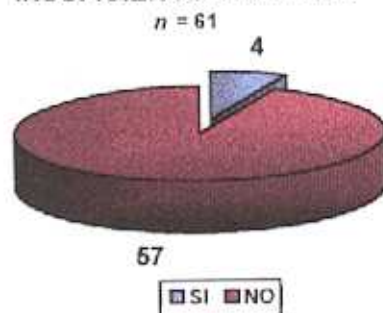


Fig P.I.A.1.g - DISTRIBUCION SEGÚN PRESENCIA O NO DE INSUFICIENCIA HEPATICA



Independientemente del cuadro clínico global con que se presentaron los casos, quisimos dejar constancia de la frecuencia con que aparecieron los distintos síntomas observados en los 61 animales incluidos en este estudio:

SINTOMATOLOGIA VISCERAL	CASOS <i>n</i>	CASOS %
Linfadenopatía generalizada	49	80.3
Linfadenopatía localizada	3	4.9
Decaimiento	12	19.7
Pérdida de peso	13	21.3
Diarrea	4	6.6
Melena	2	3.3
Vómitos	2	3.3
Dolor abdominal	1	1.6
Cojeras	12	19.7
Poliuria/Polidipsia	9	14.7
Oliguria	3	4.9
Hematuria	1	1.6
Tos/Descarga nasal	1	1.6
Uveítis	3	4.9

SINTOMATOLOGÍA CUTÁNEA	CASOS n	CASOS %
Alopecia	17	27.9
Descamación	17	27.9
Hiperpigmentación	4	6.6
Eritema	4	6.6
Prurito	3	4.9
Ulceras/Costras	13	21.3
Nódulos	3	4.9
Pústulas	1	1.6
Onicogriposis	8	13.1
Conjuntivitis	4	6.6
Otitis	1	1.6
Localización de las lesiones cutáneas	Casos n	Casos %
Pabellones auriculares	12	19.7
Facial	9	14.7
Extremidades	10	16.4
Generalizada	9	14.7
Otras localizaciones	4	6.6

El hallazgo más frecuente fue una linfadenopatía generalizada (en torno a un 80% de los perros). En tres casos, sin embargo, se encontró como único signo de la enfermedad una linfadenopatía localizada que fue especialmente marcada en dos de ellos, en los que la afección se restringía a un sólo ganglio preescapular, muy prominente, cuya citología reveló, en ambos casos, la presencia de abundantes amastigotes.

La alopecia y la descamación, seguidas de las lesiones ulcerocostrosas y, en menor grado, de un crecimiento exagerado y anormal de las uñas, fueron los síntomas cutáneos presentes en un mayor número de animales. Estas lesiones se localizaron, preferentemente en la zona distal de los pabellones auriculares, en extremidades (sobre todo en el tercio distal de las mismas) y en la cara (principalmente alrededor de los ojos y en el puente de la nariz). También fue relativamente frecuente la observación de lesiones cutáneas generalizadas. En casi todos los casos la distribución de las lesiones fue bilateral.

El decaimiento y la pérdida de peso (presente en alrededor de un 20% de los casos) fueron generalmente moderados, excepto en algunos de los perros en fases avanzadas de la enfermedad en los que llegó a detectarse una verdadera postración. En un caso en fase de estado la pérdida de peso se acompañó de una atrofia muscular generalizada muy marcada.

La presencia de cojeras localizadas en alguna extremidad o generalizadas fue relativamente frecuente (casi en el 20% de los casos).

Por el contrario, los sistemas digestivo y respiratorio se vieron afectados en pocos casos. De igual forma, pocos fueron los perros en los que se detectó la presencia de uveítis.

Entre los síntomas más frecuentemente encontrados relacionados con el aparato urinario destacan, sin duda, la poliuria y la polidipsia.

P.I.A.2.- VARIABLES CONTINUAS

• Valores medios, mínimos y máximos

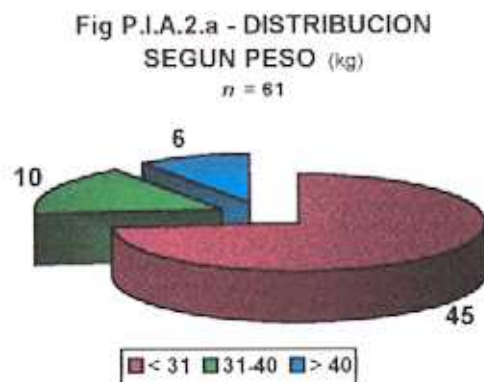
En la tabla P.A.2.1 se recogen los valores medios, máximos y mínimos, en el momento del diagnóstico, de las distintas variables numéricas consideradas. Estos datos serán comparados con los obtenidos en momentos posteriores para poder valorar la evolución de estos parámetros, a lo largo del tiempo de seguimiento post-tratamiento.

VARIABLE NUMERICA	n	m ± σ	mínimo	máximo
PESO (kg)	61	26.36±12.31	4.50	62
TITULO RECIPROCO	61	2193.44±2337.15	200	6400
PROT TOT (g/dl)	61	8.27±1.73	5.20	12
ALBUMINA (g/dl)	61	2.38±0.66	1.00	3.59
α-GLO (g/dl)	61	0.83±0.25	0.36	1.46
β-GLO (g/dl)	61	2.24±0.68	1.25	4.84
γ-GLO (g/dl)	61	2.84±1.88	0.58	8.50
ALB/GLO	61	0.48±0.27	0.08	1.19
HEMATOCRITO (%)	61	40.83±8.70	21.30	65
HEMOGLOBINA (g/dl)	61	13.40±2.93	6.20	19.20
G. ROJOS (x10 ³ /mm ³)	61	5810.16±1290.70	2370	9060
G. BLANCOS (/mm ³)	61	9988.53±3896.58	2400	20300
NEUTROFILOS (/mm ³)	61	6673.26±2857.38	1968	15480
LINFOCITOS (/mm ³)	61	2303.08±1690.94	384	9440
EOSINOFILOS (/mm ³)	61	522.36±654.8	0	3451
MONOCITOS (/mm ³)	61	485.93±384.12	0	2030
UREA (mg/dl)	61	48.98±42.63	18	257
CREATININA (mg/dl)	44	1.10±0.73	0.40	4.40
ALT (U/l)	61	29.43±28.30	9	172

Tabla P.I.A.2.1 - Valores medios, máximos y mínimos de las variables numéricas en el momento del diagnóstico.

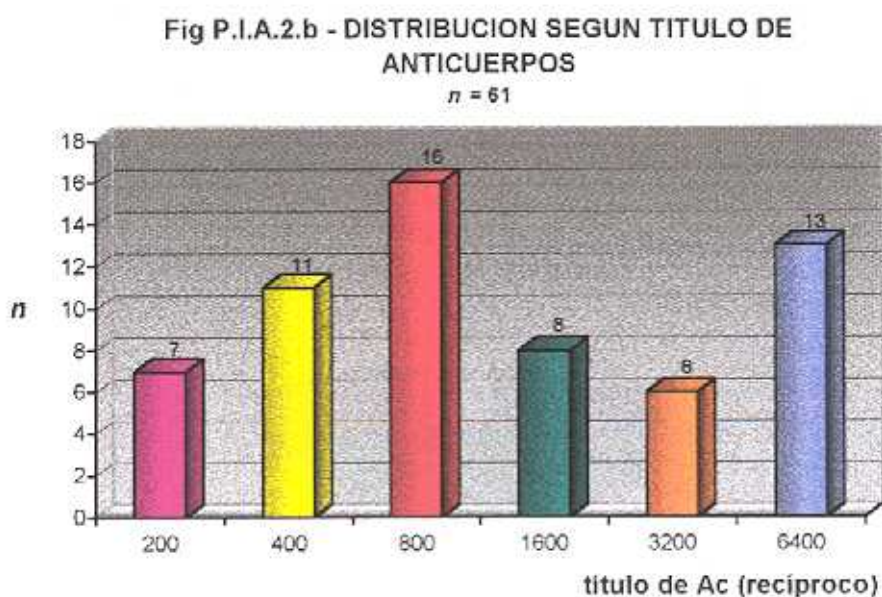
- **Distribución según peso (kg)**

Teniendo en cuenta que las dosis de Glucantime® administradas fueron ajustadas según el peso del animal, estableciéndose una dosis máxima diaria de 4500 mg de antimonio de meglumine/animal, los perros por encima de 30 kg habrían recibido dosis proporcionalmente inferiores, tanto menores cuanto mayor fue el peso de los mismos. Por esta razón, la muestra fue clasificada en las 3 categorías que aparecen en la figura P.I.A.2.a. Como puede apreciarse, la mayoría de los perros pesaron, en el momento de diagnóstico, 30 kg o menos.



- **Distribución según título de anticuerpos (reciproco)**

La figura P.I.A.2.b muestra la distribución de los casos en función del título de anticuerpos, por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el momento del diagnóstico.



- **Distribución según las distintas fracciones del proteinograma**

Con el fin de conocer más detalladamente nuestra muestra, en relación con estas variables, los casos no sólo fueron clasificados según presentaran valores normales (representados en las figuras por el color granate) o alterados de dichas variables en el momento del diagnóstico, sino que aquellos animales que mostraron valores alterados fueron integrados en distintas modalidades atendiendo a la mayor o menor intensidad de las anomalías analíticas (figuras P.I.A.2.c, P.I.A.2.d, P.I.A.2.e, P.I.A.2.f, P.I.A.2.g y P.I.A.2.h).

Fig P.I.A.2.c - DISTRIBUCION SEGUN PROTEINAS TOTALES (g/dl)
n = 61

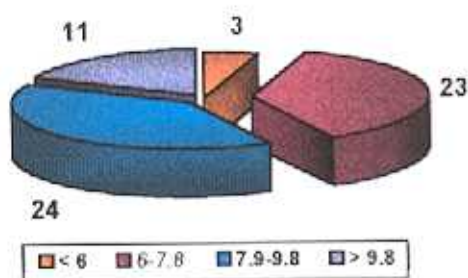


Fig P.I.A.2.d - DISTRIBUCION SEGUN ALBUMINA (g/dl)
n = 61

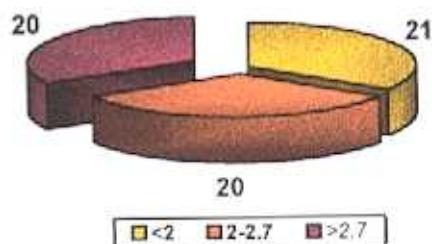


Fig P.I.A.2.e - DISTRIBUCION SEGUN ALFA-GLOBULINAS (g/dl)
n = 61

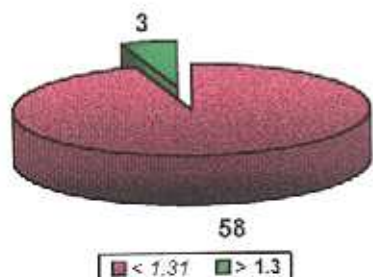


Fig P.I.A.2.f - DISTRIBUCION SEGUN BETA-GLOBULINAS (g/dl)
n = 61

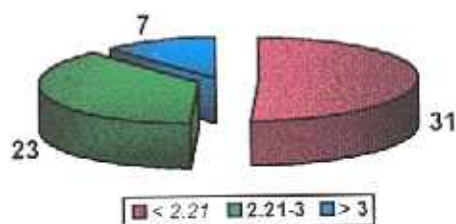


Fig P.I.A.2.g - DISTRIBUCION SEGUN GAMMA-GLOBULINAS (g/dl)
n = 61

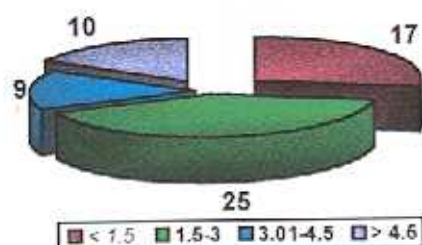
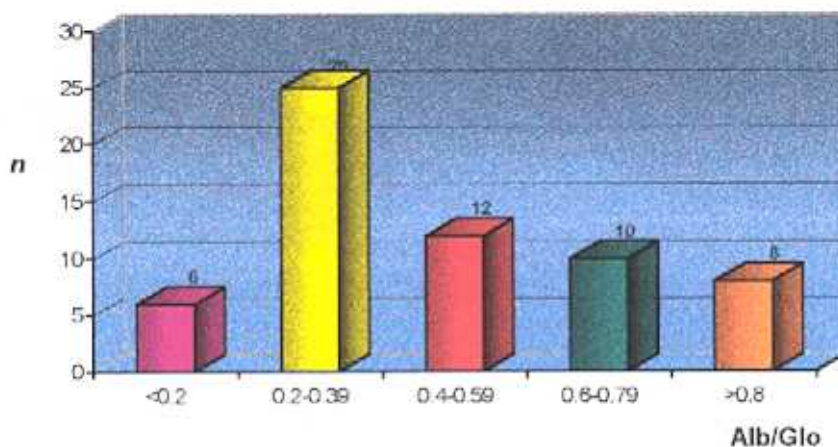


Fig P.I.A.2.h - DISTRIBUCION SEGUN COCIENTE ALB/GLO

n = 61



Estos resultados ponen de manifiesto un incremento más o menos intenso en la concentración de las proteínas plasmáticas totales acompañado de un aumento de las γ -globulinas en un alto porcentaje de casos y, en menor proporción, de una elevación moderada de las β -globulinas. Dos tercios de la población mostraron unos niveles de albúmina plasmática inferiores a los fisiológicos. En consecuencia y como recoge la figura P.I.A.2.h, los resultados del cociente Alb/Glo se vieron perturbados alejándose considerablemente, en muchos casos, de los valores habitualmente hallados en situación fisiológica.

• **Distribución según los parámetros del eritro y leucograma**

Los perros fueron clasificados en función de los distintos parámetros de la serie roja según presentaran, en el momento del diagnóstico, valores normales (representados en las figuras por el color granate), moderadamente bajos o bajos de los mismos (figuras P.I.A.2.i, P.I.A.2.j y P.I.A.2.k).

Fig P.I.A.2.i - DISTRIBUCION SEGUN GLOBULOS ROJOS (millones/mm cúbico)

n = 61

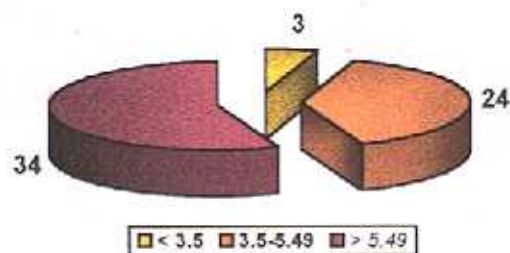


Fig P.I.A.2.j - DISTRIBUCION SEGUN HEMATOCRITO (%)
n = 61

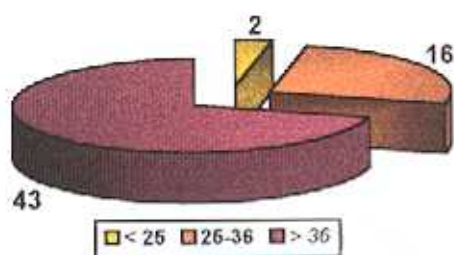
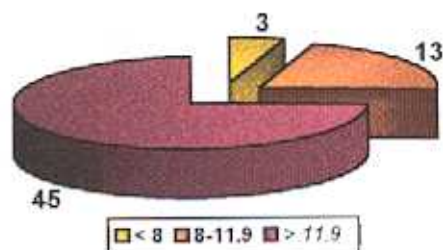


Fig P.I.A.2.k - DISTRIBUCION SEGUN HEMOGLOBINA (g/dl)
n = 61



La clasificación de los casos en función de las variables relacionadas con la serie blanca quedó determinada según los valores analíticos se hallaran por encima, por debajo o dentro del rango fisiológico (representado en las figuras por el color granate). Los resultados aparecen detallados en las figuras P.I.A.2.i, P.I.A.2.m, P.I.A.2.n, P.I.A.2.ñ y P.I.A.2.o).

Fig P.I.A.2.i - DISTRIBUCION SEGUN GLOBULOS BLANCOS (/mm cúbico)
n = 61

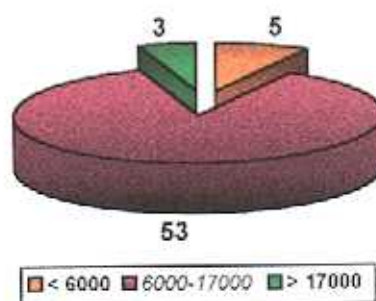


Fig P.I.A.2.m - DISTRIBUCION SEGUN NEUTROFILOS (/mm cúbico)
n = 61

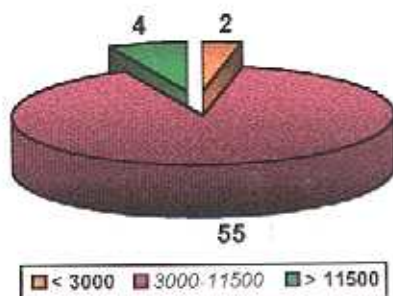
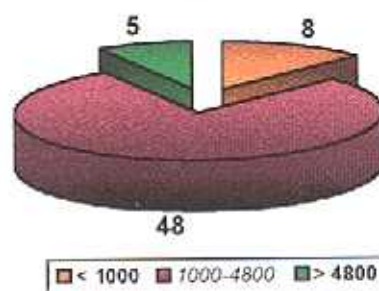
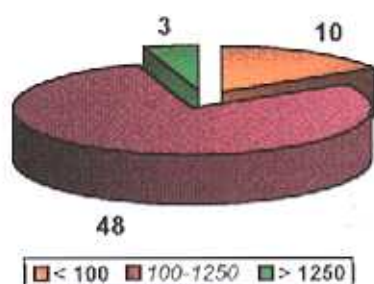


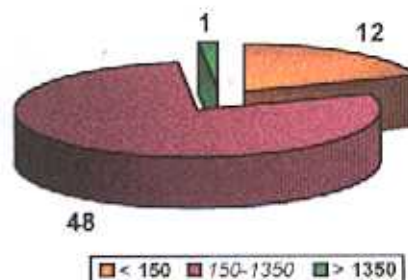
Fig P.I.A.2.n - DISTRIBUCION SEGUN LINFOCITOS (/mm cúbico)
n = 61



**Fig P.I.A.2.ñ - DISTRIBUCION
SEGUN EOSINOFILOS (/mm cúbico)**
n = 61



**Fig P.I.A.2.o - DISTRIBUCION
SEGUN MONOCITOS (/mm cúbico)**
n = 61

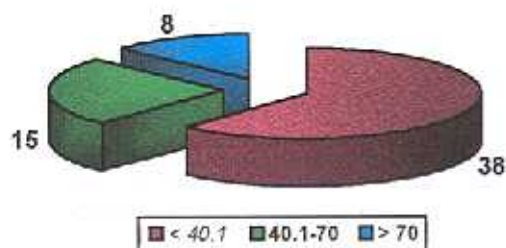


Nuestra muestra presentó, mayoritariamente, valores normales en los parámetros de la serie roja. No obstante, algo más del 25% de los casos presentaron un cierto grado de anemia. La serie blanca se vio alterada en una proporción reducida de animales, aunque se detectaron animales con valores por debajo y por encima del rango fisiológico en cada una de las variables del leucograma.

- **Distribución según los parámetros del perfil hepático y renal**

La frecuencia con que se presentaron las distintas modalidades de estas variables en el momento del diagnóstico se muestra en las figuras P.I.A.2.p, P.I.A.2.q y P.I.A.2.r. Los casos que presentaron aumentos de urea y ALT plasmáticas por encima de los rangos fisiológicos (representados por el color granate en las figuras) se repartieron en dos grupos según mostraran valores moderadamente altos o muy altos, ya que estas diferencias fueron determinantes a la hora de clasificar a los animales según la fase de la enfermedad.

**Fig P.I.A.2.p - DISTRIBUCION
SEGUN UREA (mg/dl)**
n = 61



**Fig P.I.A.2.q - DISTRIBUCION
SEGUN CREATININA (mg/dl)**
n = 44

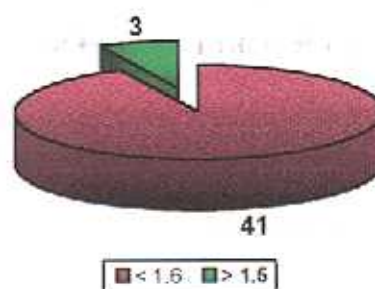
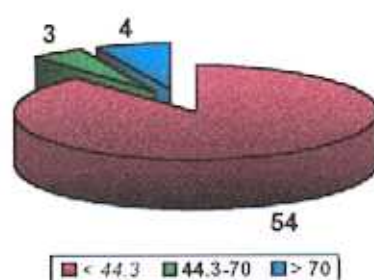


Fig P.I.A.2.r - DISTRIBUCION
SEGUN ALT (U/l)
n = 61



Todos los animales que presentaron valores elevados de uno o varios de estos parámetros fueron incluidos dentro de la fase avanzada de la enfermedad. Como se detallará más adelante, entre los perros en fase avanzada cuatro presentaron valores altos de ALT y ocho mostraron un incremento importante en los niveles de urea acompañado, en tres de ellos, de un aumento patológico de la creatinina plasmática.

P.I.B.- CARACTERIZACION

En este apartado se recogen los resultados de la estadística analítica de nuestra colección de datos, quedando reflejada la relación existente entre las distintas variables.

Como se comentó en materiales y métodos, algunas de estas variables fueron utilizadas como criterios para definir las categorías de otras como fase de la enfermedad, afección hepática, etc. Por este motivo, es lógico que tales variables presenten dependencia con respecto a aquellas consideradas para determinarlas. Sin embargo, creímos necesario comprobar la posible existencia de asociación entre el resto de las variables, no tanto para realizar estimaciones clínicas y biopatológicas de la leishmaniosis canina, sino con el fin de definir correctamente nuestra muestra de estudio.

P.I.B.1.- RELACIONES DE LAS VARIABLES NOMINALES

Las asociaciones entre cada variable nominal y el resto de las variables cualitativas fueron calculadas utilizando el test de χ^2 , mientras que las relaciones entre cada una de dichas variables y las cuantitativas o numéricas se hallaron mediante análisis de varianza (ANOVA).

A continuación quedan reflejadas todas las asociaciones estadísticamente significativas encontradas para cada variable nominal (tablas P.I.B.1.1, P.I.B.1.2, P.I.B.1.3 y P.I.B.1.4):

VARIABLE CUANTITATIVA	MACHOS $m \pm \sigma$ (p) n = 31	HEMBRAS $m \pm \sigma$ (p) n = 30	GLOBAL $m \pm \sigma$ n = 61
PESO (kg)	29.76 ± 14.17 (0.015)	22.85 ± 8.76 (0.015)	26.36 ± 12.31
TITULO RECIPROCO	1658.06 ± 1955.76 (0.036)	2746.67 ± 2559.65 (0.036)	2193.44 ± 2337.15
ALBUMINA (mg/dl)	2.53 ± 0.64 (0.033)	2.22 ± 0.65 (0.033)	2.38 ± 0.66

Tabla P.I.B.1.1 – Asociaciones entre el sexo y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

VARIABLE CUANTITATIVA		JOVENES $m \pm \sigma$ (p) n = 12	ADULTOS $m \pm \sigma$ (p) n = 37	VIEJOS $m \pm \sigma$ (p) n = 12	GLOBAL $m \pm \sigma$ n = 61
β-GLOBULINAS (g/dl)		1.95 ± 0.40 (0.049)	No Significativo	No Significativo	2.24 ± 0.68
HEMOGLOBINA (g/dl)		No Significativo	12.36 ± 3.16 (0.038)	No Significativo	13.40 ± 2.93
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	JOVENES % (p) n = 12	ADULTOS % (p) n = 37	VIEJOS % (p) n = 12	GLOBAL % n = 61
C. CLINICO	ASINTOMATICO	33.33 (0.041)	-	-	13.11
FASE	ESTADO	-	70.27 (0.012)	-	57.38

Tabla P.I.B.1.2 – Asociaciones entre la edad y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

VARIABLE CUANTITATIVA		INICIAL $m \pm \sigma$ (p) n = 13	ESTADO $m \pm \sigma$ (p) n = 35	AVANZADA $m \pm \sigma$ (p) n = 13	GLOBAL $M \pm \sigma$ n = 61
TITULO RECIPROCO		446.15 ± 249.97 (0.001)	2794.29 ± 439.90 (0.010)	No Significativo	2193.44 ± 2337.15
PROTEINAS TOTALES (g/dl)		6.97 ± 0.77 (0.001)	8.81 ± 1.63 (0.003)	No Significativo	8.27 ± 1.73
ALBUMINA (g/dl)		3.17 ± 0.22 (0.000)	No Significativo	1.82 ± 0.37 (0.000)	2.38 ± 0.66
α-GLOBULINAS (g/dl)		0.68 ± 0.20 (0.008)	No Significativo	No Significativo	0.83 ± 0.25
β-GLOBULINAS (g/dl)		1.98 ± 0.45 (0.048)	No Significativo	No Significativo	2.24 ± 0.68
γ-GLOBULINAS (g/dl)		1.18 ± 0.34 (0.000)	3.33 ± 1.75 (0.010)	No Significativo	2.84 ± 1.88
ALB/GLO		0.85 ± 0.16 (0.000)	0.39 ± 0.20 (0.003)	0.32 ± 0.12 (0.008)	0.48 ± 0.27
HEMOGLOBINA (g/dl)		15.64 ± 1.82 (0.001)	12.68 ± 2.79 (0.013)	No Significativo	13.40 ± 2.93
HEMATOCRITO (%)		46.69 ± 4.79 (0.003)	38.98 ± 8.42 (0.028)	No Significativo	40.83 ± 8.70
GLOBULOS ROJOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		6575.38 ± 920.62 (0.008)	No Significativo	No Significativo	5810.16 ± 1290.70
NEUTROFILOS ($/\text{mm}^3$)		5453.39 ± 2732.6 (0.043)	No Significativo	No Significativo	6673.26 ± 2857.38
MONOCITOS ($/\text{mm}^3$)		307.92 ± 202.25 (0.031)	No Significativo	No Significativo	485.93 ± 384.12
UREA (mg/dl)		No Significativo	33.24 ± 10.93 (0.000)	100.46 ± 68.29 (0.000)	48.98 ± 42.63
CREATININA (mg/dl)		No Significativo	0.83 ± 0.23 (0.003)	1.81 ± 1.21 (0.000)	1.10 ± 0.73
ALT (U/l)		No Significativo	19.42 ± 8.21 (0.001)	58.23 ± 47.84 (0.000)	29.43 ± 28.30
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	INICIAL % (p) n = 13	ESTADO % (p) n = 35	AVANZADA % (p) n = 13	GLOBAL % n = 61
C. CLINICO	ASINTOMATICO	61.54 (0.000)	-	-	13.11
EDAD	ADULTO	-	74.29 (0.012)	-	60.66
INSUFICIENCIA RENAL	NO	-	100 (0.001)	-	86.89
	SI	-	-	61.54 (0.000)	13.11
INSUFICIENCIA HEPATICA	NO	-	100 (0.029)	-	93.94
	SI	-	-	30.77 (0.001)	6.56

Tabla P.I.B.1.3 – Asociaciones entre la fase de la enfermedad y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

VARIABLE CUANTITATIVA		ASINTOMAT. <i>m±σ</i> (<i>p</i>) <i>n</i> = 8	CUTANEO <i>M±σ</i> (<i>p</i>) <i>n</i> = 16	VISCERAL <i>m±σ</i> (<i>p</i>) <i>n</i> = 18	MIXTO <i>m±σ</i> (<i>p</i>) <i>n</i> = 19	GLOBAL <i>m</i> <i>±σ</i> <i>n</i> = 61
PESO (kg)		36.25±14.85 (0.008)	No Significativo	No Significativo	21.36±13.24 (0.023)	26.36 ±12.31
TITULO RECIPROCO		425.00±233.18 (0.011)	No Significativo	No Significativo	No Significativo	2193.44 ±2337.15
PROTEINAS TOTALES (g/dl)		7.10±0.57 (0.021)	No Significativo	No Significativo	8.92±2.00 (0.027)	8.27 ±1.73
ALBUMINA (g/dl)		3.29±0.15 (0.000)	No Significativo	No Significativo	2.06±0.60 (0.006)	2.38 ±0.66
α-GLOBULINAS (g/dl)		No Significativo	0.71±0.22 (0.018)	1.00±0.21 (0.000)	No Significativo	0.83 ±0.25
β-GLOBULINAS (g/dl)		1.85±0.34 (0.043)	No Significativo	No Significativo	No Significativo	2.24 ±0.68
γ-GLOBULINAS (g/dl)		1.22±0.32 (0.005)	No Significativo	No Significativo	3.69±2.29 (0.009)	2.84 ±1.88
ALB/GLO		0.88±0.16 (0.000)	No Significativo	No Significativo	0.34±0.18 (0.004)	0.48 ±0.27
HEMOGLOBINA (g/dl)		16.19±1.80 (0.002)	No Significativo	No Significativo	11.80±2.95 (0.002)	13.40 ±2.93
HEMATOCRITO (%)		48.10±4.22 (0.006)	No Significativo	No Significativo	36.55±9.42 (0.005)	40.83 ±8.70
GLOBULOS ROJOS (x10 ³ /mm ³)		6392.50±624.17 (0.034)	No Significativo	No Significativo	5244.21±1491.40 (0.011)	5810.16 ±1290.70
GLOBULOS BLANCOS (/mm ³)		3975.00±1714.46 (0.010)	No Significativo	No Significativo	No Significativo	9988.53 ±3896.58
NEUTROFILOS (/mm ³)		4446.50±845.51 (0.013)	No Significativo	No Significativo	No Significativo	6673.26 ±2857.38
MONOCITOS (/mm ³)		252.38±63.24 (0.034)	No Significativo	No Significativo	No Significativo	485.93 ±384.12
EOSINOFILOS (/mm ³)		No Significativo	888.75±1078.48 (0.005)	No Significativo	No Significativo	522.36 ±654.38
UREA (mg/dl)		No Significativo	30.94±12.89 (0.025)	70.39±63.59 (0.006)	No Significativo	48.98 ±42.63
CREATININA (mg/dl)		No Significativo	No Significativo	1.51±1.11 (0.006)	No Significativo	1.10 ±0.73
ALT (U/l)		No Significativo	No Significativo	No Significativo	41.08±39.59 (0.016)	29.43 ±28.30
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	ASINTOMAT. % (<i>p</i>) <i>n</i> = 8	CUTANEO % (<i>p</i>) <i>n</i> = 16	VISCERAL % (<i>p</i>) <i>n</i> = 18	MIXTO % (<i>p</i>) <i>n</i> = 19	GLOBAL % <i>n</i> = 61
FASE	INICIAL	100 (0.000)	-	-	-	21.31
EDAD	JOVENES	50 (0.041)	-	-	-	19.67

Tabla P.I.B.1.4 – Asociaciones entre el cuadro clínico y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

Tras el análisis de todos estos resultados destacamos la existencia de una estrecha relación entre el cuadro clínico observado y la fase de la enfermedad, establecida en el momento del diagnóstico, así como entre esta última y la presencia de una afección renal o hepática. Lógicamente, las fases iniciales presentaron los mayores porcentajes de cuadros asintomáticos, mientras que en las fases avanzadas se incluyeron un mayor número de perros con afección renal o hepática (tabla P.I.B.1.3).

El sexo no mostró relación alguna con el resto de las variables cualitativas (tabla P.I.B.1.1). Sin embargo, la edad se asoció significativamente al cuadro clínico y a la fase de la enfermedad, de manera que los perros menores de 2 años presentaron una mayor proporción de cuadros asintomáticos. Los adultos, por su parte, se incluyeron mayoritariamente en las fases de estado (tabla P.I.B.1.2).

En cuanto a las asociaciones entre las variables cualitativas y cuantitativas, observamos cómo las hembras mostraron unos niveles inferiores de albúmina y peso que los machos, mientras que éstos presentaron unas tasas de anticuerpos más bajas (tabla P.I.B.1.1).

Por otra parte, sólo se apreció asociación inversa entre la edad y los valores medios de β -globulinas y hemoglobina para los menores de 2 años y los adultos, respectivamente (tabla P.I.B.1.2).

En lo que se refiere a la fase de la enfermedad, comentaremos sólo las asociaciones significativas encontradas entre ésta y los valores del hemograma, ya que el resto de las variables cuantitativas fueron consideradas a la hora de establecer las distintas categorías dentro del grupo fase de la enfermedad.

Aunque siempre dentro de los rangos fisiológicos, los valores medios de la serie roja arrojan las cifras más elevadas en las fases iniciales, mientras que el número de neutrófilos y monocitos queda por debajo de las medias de nuestra muestra global.

A pesar de que los perros en fase de estado presentaron unas medias de hemoglobina y hematocrito inferiores a las medias globales, éstas se mantuvieron dentro de los valores fisiológicos, sin que pudieran detectarse valores medios que se correspondieran con anemia, en ninguno de los distintos estadios de la enfermedad (tabla P.I.B.1.3).

Al considerar el cuadro clínico observamos resultados similares a los obtenidos con respecto a la fase de la enfermedad. No obstante, en la clasificación por cuadro clínico no se tuvieron en cuenta los datos laboratoriales, por lo que las asociaciones encontradas con éstos resultan menos sesgadas y proporcionan datos más relevantes a la hora de caracterizar cada modalidad del grupo clínico.

Así, tenemos que los perros considerados asintomáticos presentaron los valores medios de la serie roja y proteinograma más centrados dentro del rango fisiológico y los títulos medios de anticuerpos y los recuentos de glóbulos blancos, neutrófilos y monocitos más bajos. Además, estos animales fueron los que presentaron un peso medio más alto.

Los perros con cuadro cutáneo mostraron los valores de eosinófilos más elevados, mientras que sus concentraciones de urea y α -globulinas fueron las más bajas de nuestra colección de datos. Los animales con cuadro visceral se caracterizaron por presentar las cifras más altas en α -globulinas, creatinina y urea (tabla P.I.B.1.4). Por último, los perros con cuadro mixto arrojaron unos valores analíticos medios similares a los hallados en las fases de estado de la enfermedad, como queda reflejado en las tablas P.I.B.1.3 y P.I.B.1.4.

P.I.B.2.- CORRELACIONES ENTRE LAS VARIABLES CONTINUAS

Por último, dentro de este apartado de caracterización, quisimos establecer las posibles asociaciones (dos a dos) entre las variables cuantitativas, en el momento del diagnóstico. Mediante el programa estadístico BMDP calculamos los coeficientes de correlación (r) entre estas variables. Teniendo en cuenta el tamaño de nuestra muestra, la correlación entre dos variables fue significativa cuando $r > 0.252$ (para una $p < 0.05$) o cuando $r > 0.327$ (para una $p < 0.01$). La tabla P.I.B.2.1 refleja los resultados de este estudio.

Entre las múltiples correlaciones significativas observadas, comentaremos aquellas encontradas entre las variables cuya dependencia no sea obvia debido a su propia naturaleza de vinculación (como, por ejemplo, los parámetros de la serie roja o de la serie blanca, ciertas variables del proteinograma, etc.).

Destacamos la estrecha correlación ($p < 0.01$) del título de anticuerpos (recíproco) con las γ -globulinas y las proteínas totales ($r > 0.67$) y, en menor grado y en relación inversa, con el cociente Alb/Glo ($r = -0.5441$) y la albúmina ($r = -0.3690$).

Asimismo, la tasa de anticuerpos, las proteínas totales, la albúmina, las γ -globulinas y el cociente Alb/Glo, presentaron correlaciones significativas ($p < 0.01$) con las variables de la serie roja (hematocrito, hemoglobina y glóbulos rojos).

Aunque no de una forma tan marcada como en los casos anteriores, la urea sólo se correlacionó significativamente ($r = 0.2719$) con las α -globulinas. Por el contrario, no encontramos correlación significativa entre la ALT y ninguna de las demás variables continuas.

A excepción de los linfocitos, el resto de los parámetros de la serie blanca mostraron una correlación directa y estadísticamente significativa (aunque casi en el límite de significación) con la fracción β -globulinas del proteinograma.

P.II - RESPUESTA A CORTO PLAZO

Una vez caracterizada la población de nuestro estudio prospectivo, la primera cuestión que nos planteamos fue determinar la respuesta inmediata (dentro de los dos meses) al tratamiento con Glucantime®, vía subcutánea, asociado a Zyloric®. Para valorar esta respuesta a corto plazo se utilizaron los mismos criterios que en el estudio retrospectivo, como quedó expuesto en materiales y métodos.

Además, quisimos comparar estos resultados con los observados cuando se utilizó la vía intramuscular a dosis similares del antimonial, sin tener en cuenta la administración o no de alopurinol ya que, como quedó demostrado, su empleo no modificó la respuesta terapéutica inicial (pág. 102).

Para poder interpretar correctamente los resultados fue necesario determinar si las distribuciones de las dos muestras, (perros tratados por vía IM y SC con dosis similares de Glucantime®) en cuanto a la fase de enfermedad, edad y sexo, podían considerarse homogéneas o no (tablas P.II.1, P.II.2 y P.II.3).

TRATAMIENTO/ FASE	G1/G1+Z-IM n	G1+Z-SC n	TOTAL n
FASE I	22	13	35
FASE E	39	35	74
FASE A	9	13	22
TOTAL	70	61	131

$\chi^2: 2.632$ g.l.: 2 $p = 0.26554$

Tabla P.II.1 - Distribución de los casos en función del tratamiento recibido (IM o SC) y de la fase de la enfermedad, en el momento del diagnóstico.

TRATAMIENTO/ EDAD	G1/G1+Z-IM n	G1+Z-SC n	TOTAL n
JOVENES	19	12	31
ADULTOS	37	37	74
VIEJOS	14	12	26
TOTAL	70	61	131

$\chi^2: 1.1215$ g.l.: 2 $p = 0.57079$

Tabla P.II.2 - Distribución de los casos en función del tratamiento recibido (IM o SC) y de la edad, en el momento del diagnóstico.

TRATAMIENTO/ SEXO	G1/G1-Z IM n	G2 - Z-SC n	TOTAL n
MACHOS	43	31	74
HEMBRAS	27	30	57
TOTAL	70	61	131

$\chi^2: 1.0921$ $g1: 1$ $p = 0.296$

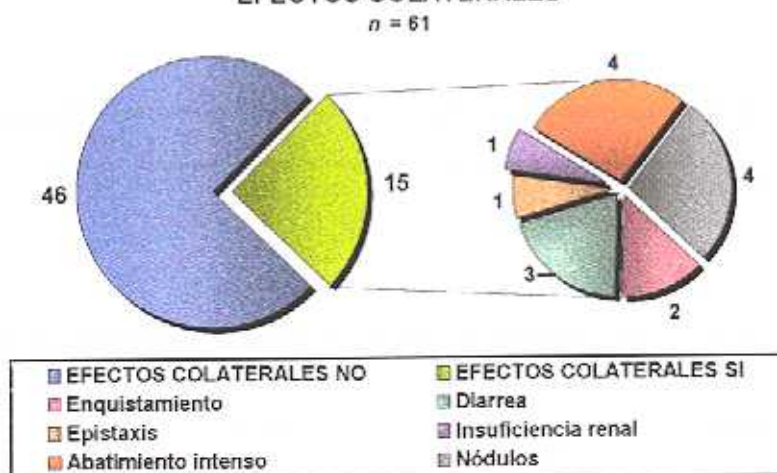
Tabla P.II.3 - Distribución de los casos en función del tratamiento recibido (IM o SC) y del sexo.

La ausencia de diferencias significativas dentro de cada una de estas distribuciones nos permitió agrupar los casos, considerándolos como procedentes de una misma muestra en cuanto al sexo, la edad y la fase de la enfermedad.

P.II.A-. EFECTOS COLATERALES AL TRATAMIENTO

Antes de entrar a analizar la respuesta propiamente dicha a corto plazo y dado que en este estudio tuvimos la oportunidad de recoger una información bastante detallada de cada caso, hemos hecho un breve repaso acerca de los efectos indeseables que, en ocasiones, aparecieron durante el tratamiento específico (figura P.II.A a). La observación de un empeoramiento de las alteraciones existentes previamente a la instauración del tratamiento, no fue considerada como un efecto colateral al mismo, sino como una respuesta desfavorable a la terapia.

Fig P.II.A.a - DISTRIBUCION SEGUN APARICION O NO DE EFECTOS COLATERALES



El desarrollo de efectos secundarios serios o alarmantes para el propietario sólo fue detectado en 15 casos, lo que supone un 24.6% del total. Aunque muchos dueños nos comunicaron una ligera apatía y disminución del apetito, que aparecía a los tres o cuatro días de iniciada la terapia, en casi todos los casos estos signos desaparecían espontáneamente antes del periodo de descanso del antimonia. Tan sólo en cuatro casos se observó anorexia y abatimiento intenso.

Dos de ellos se encontraban en fase avanzada de la enfermedad en el momento del diagnóstico y fueron sacrificados; los otros dos, en fase de estado, continuaron el tratamiento y mostraron una respuesta muy favorable al mismo.

La aparición de nódulos de distinto tamaño (de unos milímetros a varios centímetros) afectó a cuatro casos y fue de presentación brusca y localización diversa, pero en ningún caso cercana al punto de inyección del antimonial. Ni la citología ni la biopsia, realizadas a partir de dos de estos casos, permitieron la identificación de *Leishmania spp* en las muestras. Al igual que la apatía y la anorexia, los nódulos aparecieron a los pocos días de iniciada la terapia y desaparecieron antes de finalizar el ciclo de tratamiento, sin necesidad de interrumpir el mismo en la mayoría de los casos. Sólo uno de estos perros, que partía con una afección renal grave, fue sacrificado como consecuencia de un empeoramiento del estado general. Fue, precisamente este caso, el único en el que los nódulos se abscesaron.

En dos casos se produjo un enquistamiento de las tres o cuatro últimas inyecciones de Glucantime® en el punto de inoculación. La tumefacción desapareció espontáneamente una vez finalizado el ciclo de tratamiento.

Tres perros desarrollaron diarrea que remitió tras reducir a la mitad o interrumpir la administración de Zyloric®.

En uno de los dos casos restantes el propietario observó un episodio aislado de epistaxis a los pocos días de iniciar la terapia, sin que se repitiera, posteriormente, durante todo el tiempo de seguimiento del animal. En el otro caso, se desarrolló un fallo renal que condujo a la decisión de sacrificar al animal antes de finalizar el ciclo de tratamiento.

Al igual que con el resto de las variables, nos pareció interesante buscar la existencia de asociaciones entre la aparición o no de efectos secundarios a la terapia y el resto de las variables nominales y cuantitativas consideradas en el momento del diagnóstico (tabla P.II.A.1).

VARIABLE CUANTITATIVA	EFFECTOS COLATERALES SI $m \pm \sigma$ (p) n = 15	EFFECTOS COLATERALES NO $m \pm \sigma$ (p) n = 46	GLOBAL $m \pm \sigma$ n = 61
α -GLOBULINAS (g/dl)	0.95 \pm 0.26 (0.014)	0.79 \pm 0.23 (0.014)	0.83 \pm 0.25

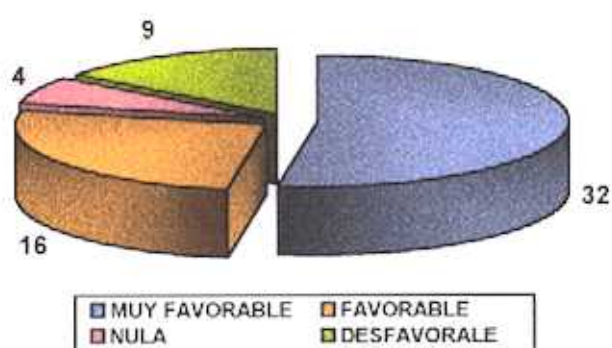
Tabla P.II.A.1 – Asociaciones entre la presentación o no de efectos colaterales y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

La única asociación significativa hallada relacionó el desarrollo de efectos colaterales con un incremento en las α -globulinas (con respecto a la media global), aunque el valor medio de éstas se mantuvo dentro del rango fisiológico.

P.II.B-. TIPO DE TRATAMIENTO/RESPUESTA A CORTO PLAZO

La respuesta clínica inmediata de los 61 casos de nuestro estudio prospectivo queda recogida en la figura P.II.B.a.

Fig P.II.B.a - DISTRIBUCION SEGÚN
RESPUESTA A CORTO PLAZO
(PARA EL TRATAMIENTO G1+Z-SC)
 $n = 61$



Observamos, en primer lugar, cómo el 78.7% de los casos (48/61) presentaron una respuesta inmediata muy favorable o favorable al tratamiento, siendo precisamente estos perros los que alcanzaron la remisión. Este porcentaje es similar al observado en el estudio anterior cuando la administración de dosis similares de antimoniales fue realizada por vía IM asociada o no a alopurinol (77.1%). Igualmente, los casos con respuesta nula y desfavorable ofrecieron unos porcentajes similares por lo que, en principio, podemos señalar la falta de diferencias significativas entre las dos vías de administración (tabla P.II.B.1), al menos, en lo que se refiere a la respuesta a corto plazo.

RESPUESTA A CORTO PLAZO / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE n	FAVORABLE n	NULA n	DESFAVORABLE n	TOTAL n
G1/G1+Z-IM	44	10	4	12	70
G1+Z-SC	32	16	4	9	61
TOTAL	76	26	8	21	131

$$\chi^2 = 3.1043 \quad \text{gl.: 3} \quad p = 0.37583$$

Tabla P.II.B.1 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido (IM o SC).

P.II.C-. FASE DE LA ENFERMEDAD/RESPUESTA A CORTO PLAZO

La respuesta inmediata obtenida en este grupo tratado por vía subcutánea, considerando la fase de la enfermedad, se recoge en la tabla P.II.C.1.

RESPUESTA A CORTO PLAZO / FASE	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I	13	0	0	0	13
FASE E	19	14	1	1	35
FASE A	0	2	3	8	13
TOTAL	32	16	4	9	61

$\chi^2 = 50.5205$ g.l.:6 $p = 3.740E-09$

Tabla P.II.C.1 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

El estudio estadístico confirma, una vez más, que las respuestas al tratamiento difieren muy significativamente según la fase de la enfermedad en que se inició éste ($p < 0.01$), obteniéndose un 100% (13/13) y un 54.3% (19/35) de respuestas inmediatas muy favorables cuando el tratamiento se instauró, respectivamente, en fases iniciales y en fases de estado de la enfermedad.

Los peores resultados se observaron en la fase avanzada (fases de agravamiento y terminales) en la que tan sólo un 15.4% (2/13 casos) presentó una respuesta favorable (tabla P.II.C.1). Estos porcentajes no difieren de los obtenidos cuando el antimonio fue administrado por vía IM, lo que confirma una respuesta similar a la terapia, en función de la fase de la enfermedad, a dosis entre 100-150 mg/kg de Glucantime®, independientemente de que la vía de administración sea IM o SC (tablas P.II.C.2 y P.II.C.3).

RESPUESTA A CORTO PLAZO (FASE I) / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z-IM	19	1	1	1	22
G1+Z-SC	13	0	0	0	13
TOTAL	32	1	1	1	35

$\chi^2 = 1.9389$ g.l.: 3 $p = 0.58518$

Tabla P.II.C.2 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido (IM o SC), para la fase inicial de la enfermedad.

RESPUESTA A CORTO PLAZO (FASE E) / TRATAMIENTO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z-IM	24	8	3	4	39
G1+Z-SC	19	14	1	1	35
TOTAL	43	22	4	5	74

$$\chi^2 = 4.8156 \quad \text{g.l.: 3} \quad p = 0.18518$$

Tabla P.II.C.3 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del tratamiento recibido (IM o SC), para la fase de estado de la enfermedad.

P.II.D-. EDAD Y SEXO/RESPUESTA A CORTO PLAZO

Aunque se observaron unos mayores porcentajes de respuestas a corto plazo muy favorables entre las hembras y los jóvenes integrados en este estudio prospectivo, el análisis estadístico demuestra, al igual que en el estudio anterior, que las diferencias observadas en la respuesta, en función de la edad y del sexo, pueden ser atribuidas al azar, lo cual queda reflejado en las tablas P.II.D.1 y P.II.D.2.

RESPUESTA A CORTO PLAZO / EDAD	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
JOVENES	9	1	1	1	12
ADULTOS	18	12	2	5	37
VIEJOS	3	3	1	3	12
TOTAL	32	16	4	9	61

$$\chi^2 = 4.9641 \quad \text{g.l.:6} \quad p = 0.54843$$

Tabla P.II.D.1 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función de la edad, en el momento del diagnóstico.

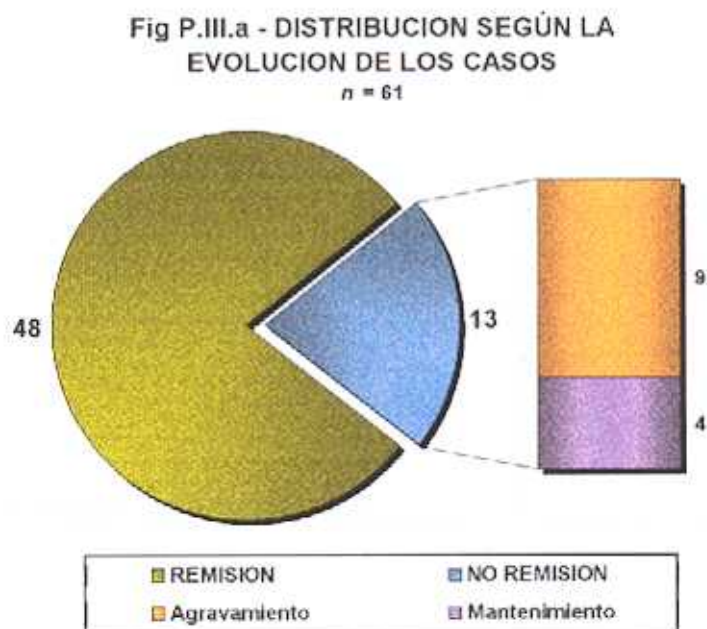
RESPUESTA A CORTO PLAZO / SEXO	MUY FAVORABLE <i>n</i>	FAVORABLE <i>n</i>	NULA <i>n</i>	DESFAVORABLE <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
MACHOS	15	8	2	6	31
HEMBRAS	17	8	2	3	30
TOTAL	32	16	4	9	61

$$\chi^2 = 1.1089 \quad \text{g.l.:3} \quad p = 0.77493$$

Tabla P.II.D.2 – Distribución del tipo de respuesta a corto plazo en función del sexo.

P.III - EVOLUCION DE LOS CASOS CLINICOS

Al igual que en el estudio retrospectivo, quisimos describir y analizar la evolución de los casos clínicos clasificándolos en las mismas categorías: remisión y no remisión y, dentro de este último, mantenimiento y agravamiento del proceso (figura P.III.a).



La distribución en estos tres grupos coincide con el tipo de respuesta inicial al tratamiento, siendo precisamente los perros que presentaron una respuesta desfavorable los que evolucionaron hacia el agravamiento. Los perros que clasificamos dentro de la evolución hacia el mantenimiento se correspondieron con aquellos cuya respuesta inicial al tratamiento fue nula, mientras que los perros que alcanzaron la remisión fueron los que tuvieron una respuesta favorable o muy favorable.

En este sentido y aunque más adelante se analizarán con mayor detalle las características de la evolución de los casos clínicos, como punto de partida quisimos caracterizar las poblaciones que alcanzaron la remisión y las que no, buscando las asociaciones existentes entre la consecución (remisión si) y la no consecución (remisión no) de la remisión y las distintas variables cualitativas (test de χ^2 y comparación de porcentajes) y cuantitativas (ANOVA y *t* de Student), consideradas en el momento del diagnóstico (tabla P.III.1).

VARIABLE CUANTITATIVA		REMISION SI <i>m±σ (p)</i> n = 48	REMISION NO <i>m±σ (p)</i> n = 13	GLOBAL <i>m±σ</i> n = 61
ALBUMINA (g/dl)		2.50±0.63 (0.003)	1.93±0.58 (0.003)	2.38±0.66
ALB/GLO		0.51±0.27 (0.040)	0.36±0.20 (0.040)	0.48±0.27
NEUTROFILOS (/mm ³)		6327.21±2750.29 (0.036)	7951.00±2882.23 (0.036)	6673.26±857.38
UREA (mg/dl)		35.23± 11.81 (0.000)	99.77±68.80 (0.000)	48.98±42.63
CREATININA (mg/dl)		0.90±0.24 (0.001)	1.71±1.20 (0.001)	1.10±0.73
ALT (U/l)		25.23±19.27 (0.014)	44.92±45.64 (0.014)	29.43±28.30
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	REMISION SI % (p) n = 48	REMISION NO % (p) n = 13	GLOBAL % n = 61
FASE	INICIAL	27.08 (0.029)	-	21.31
	ESTADO	68.75 (0.001)	-	57.38
	AVANZADA	-	84.62 (0.000)	21.31
INSUFICIENCIA RENAL	NO	100 (0.000)	-	86.89
	SI	-	61.54 (0.000)	13.11
RESPUESTA A CORTO PLAZO	MUY FAVORAB.	66.67 (0.000)	-	52.46
	FAVORABLE	33.33 (0.011)	-	26.23
	NULA	-	30.77 (0.001)	6.16
	DESFAVORABLE	-	69.23 (0.000)	14.75

Tabla P.III.1 – Asociaciones entre el tipo de evolución a medio plazo (remisión sí o no) y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

En este primer análisis se establecieron diferencias significativas entre la consecución y la no consecución de la remisión en función del tipo de respuesta a corto plazo (como ya se había comentado previamente), de la fase de la enfermedad, del recuento de neutrófilos, de la concentración de albúmina, del valor del cociente Alb/Glo, del estado de la función renal y del valor de los parámetros del perfil hepático y renal, en el momento del diagnóstico (tabla P.III.1).

P.III.A. EVOLUCION HACIA LA NO REMISION

P.III.A.1. EVOLUCION HACIA EL AGRAVAMIENTO

Nueve casos, lo que representa un 14.75% del total de nuestra muestra, presentaron una evolución hacia el agravamiento.

Ocho de estos perros se encontraban en fase avanzada en el momento del diagnóstico, la mitad de ellos con una sintomatología visceral y la otra mitad con un cuadro mixto. Tan sólo un animal incluido en este grupo se encontraba en fase de estado y mostraba un cuadro eminentemente cutáneo, en el momento del diagnóstico.

Seis de los ocho casos diagnosticados en fase avanzada presentaban, inicialmente, una afección renal con unos valores de urea elevados (>70 mg/dl), de los cuales tres mostraron niveles altos de creatinina (>1.5 mg/dl).

Los dos perros restantes diagnosticados en fase avanzada padecían una insuficiencia hepática, uno de ellos, y una lesión cardíaca grave, el otro.

Antes y durante la terapia específica estos animales fueron tratados sintomáticamente (fluidoterapia, dietas hipoproteicas, etc), con el fin de mejorar su estado general. Aun así, todos estos perros murieron o fueron sacrificados, dentro de las tres primeras semanas de iniciado el tratamiento específico, como consecuencia de un agravamiento de las lesiones ya presentes en el momento del diagnóstico.

El caso diagnosticado en fase de estado fue una perra preñada que desarrolló, tras la instauración de la terapia, una insuficiencia renal (por lo que también fue incluido en el apartado de efectos colaterales). Esto determinó la decisión de sacrificarla cuando la gestación estaba a término y antes de finalizar el primer ciclo de tratamiento. Previamente se realizó una cesárea con una mortalidad de la camada del 100%.

Esta serie de animales con evolución hacia el agravamiento, se corresponde con el grupo de animales que presentó una respuesta a corto plazo desfavorable. El estudio estadístico reveló la existencia de asociaciones significativas entre tal evolución y los siguientes parámetros (tablas P.II.A.1.1):

VARIABLE CUANTITATIVA		RESPUESTA DESFAVORABLE $m \pm \sigma$ (p) n = 9	GLOBAL $m \pm \sigma$ n = 61
ALBUMINA (g/dl)		1.86 ± 0.33 (0.006)	2.38 ± 0.66
ALB/GLO		0.31 ± 0.07 (0.021)	0.48 ± 0.27
α-GLOBULINAS (g/dl)		0.99 ± 0.31 (0.017)	0.83 ± 0.25
GLOBULOS BLANCOS (/mm ³)		12011.11 ± 3971.13 (0.047)	9988.53 ± 3896.58
NEUTROFILOS (/mm ³)		8339.67 ± 3231.99 (0.030)	6673.26 ± 2857.38
UREA (mg/dl)		112.56 ± 73.88 (0.000)	48.98 ± 42.63
CREATININA (mg/dl)		2.20 ± 1.26 (0.000)	1.10 ± 0.73
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	RESPUESTA DESFAVORABLE % (p) n = 9	GLOBAL % n = 61
FASE	AVANZADA	88.89 (0.000)	21.31
INSUF. RENAL	SI	66.67 (0.000)	13.11

Tabla P.III.A.1.1 – Asociaciones entre la respuesta terapéutica a corto plazo desfavorable (evolución hacia el agravamiento) y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

Observamos cómo la población con una respuesta inicial desfavorable presentó, en el momento del diagnóstico, unos valores medios de albúmina y un cociente Alb/Glo significativamente inferiores a la media de la población estudiada. Por el contrario, los niveles medios de α -globulinas, así como el recuento de glóbulos blancos y, en particular de neutrófilos, fueron superiores. Las variables del perfil renal (urea y creatinina) mostraron, igualmente, valores por encima de la media.

P.III.A.2-. EVOLUCION HACIA EL MANTENIMIENTO

Constituido por 4 individuos, un 6.6% del total de nuestro estudio, en este grupo se incluyen los casos que presentaron una cierta mejoría o estabilización del proceso, pero ni alcanzaron una remisión clínica y biopatológica completas ni tampoco sufrieron un drástico empeoramiento del proceso tras la instauración del tratamiento.

El seguimiento de estos casos se prolongó por encima del año e, incluso, más allá de los dos 2 años en uno de ellos.

Tres de los perros incluidos en este grupo fueron diagnosticados en fase avanzada de la enfermedad, dos de los cuales presentaban en ese momento una insuficiencia renal con una elevación importante de la urea. Estos dos perros fueron sometidos a tres ciclos de tratamiento a lo largo del tiempo de seguimiento consiguiéndose, durante este periodo, reducciones importantes en los niveles plasmáticos de urea, aunque no se alcanzaron valores normales de la misma ni se llegó a obtener un perfil normal del proteinograma. Ambos animales fueron sacrificados tras un año y medio de seguimiento como consecuencia de una reagudización del proceso renal.

El otro caso diagnosticado en fase avanzada mostró una insuficiencia hepática puesta en evidencia por una elevación muy acentuada de la ALT (GPT), AST (GOT), GGT y fosfatasa alcalina. Este perro, sometido a un solo ciclo de tratamiento, evolucionó favorablemente de las lesiones cutáneas y de las cojeras presentes antes de iniciar la terapia específica. Sin embargo, la lesión hepática se mantuvo más o menos estable durante un tiempo, agravándose a partir de los 21 meses tras el diagnóstico de la enfermedad, lo que desembocó en el sacrificio del animal 7 meses después de dicho agramiento.

El último caso integrado en este grupo era un perro diagnosticado en fase de estado que se presentó a consulta con cojeras, atrofia muscular y delgadez importantes. A pesar de la administración de tres ciclos de tratamiento y de la imposibilidad de detectar otro proceso concurrente, la mejoría clínica aunque evidente no desembocó en la resolución completa de la sintomatología. Algunos parámetros biopatológicos llegaron a normalizarse, sin embargo, el título de anticuerpos no descendió significativamente en ningún momento durante el tiempo de seguimiento (20 meses).

Este grupo coincide con el que presentó una respuesta terapéutica nula a corto plazo.

El análisis estadístico (tabla P.III.A.2.1) puso de relieve, en esta serie de animales, la presencia de unos valores medios de ALT más altos y de β -globulinas plasmáticas más bajas que los valores medios globales, en el momento del diagnóstico.

VARIABLE CUANTITATIVA		RESPUESTA NULA $m \pm \sigma$ (p) n = 4	GLOBAL $m \pm \sigma$ n = 61
β -GLOBULINAS (g/dl)		1.68 \pm 0.19 (0.045)	2.24 \pm 0.68
ALT (U/l)		70.50 \pm 60.49 (0.001)	29.43 \pm 28.30
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	RESPUESTA NULA % (p) n = 9	GLOBAL % n = 61
FASE	AVANZADA	75 (0.028)	13.11

Tabla P.III.A.2.1 – Asociaciones entre la respuesta terapéutica a corto plazo nula (evolución hacia el mantenimiento) y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

P.III.B-. EVOLUCION HACIA LA REMISION

Un total de 48 casos (78.7%), todos ellos con respuesta favorable o muy favorable, alcanzaron la remisión tras la instauración de la terapia, en algún momento del seguimiento. Hay que precisar que cinco de estos perros presentaron una ehrlichiosis concurrente que fue tratada específica y exitosamente con doxiciclina o dipropionato de imidocarb, de forma simultánea a la terapia anti-leishmaniósica.

El grupo que alcanzó la remisión, tras una respuesta muy favorable, se caracterizó por integrar a todos los animales que se hallaban en fases iniciales de enfermedad en el momento de diagnóstico e incluir, mayoritariamente, animales sin apenas sintomatología y clasificados con una correcta función hepática y renal. Los valores analíticos en el momento del diagnóstico, si bien pudieron verse alterados, fueron los que se aproximaron más a la normalidad, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de las proteínas totales, la albúmina, las γ -globulinas, el cociente Alb/Glo, el eritrograma, la urea y la ALT del grupo que remitió tras una respuesta muy favorable y los de la población global de este estudio prospectivo (tabla P.III.B.1).

Los perros que, igualmente, alcanzaron la remisión pero de una forma más lenta (respuesta favorable) fueron, en su mayoría (87.5%), diagnosticados en fase de estado y los valores medios de los parámetros analíticos de este grupo aparecieron, en el momento del diagnóstico, más alterados que los de la población global (tabla P.III.B.1).

VARIABLE CUANTITATIVA		MUY FAVORABLE <i>m±σ (p)</i> <i>n = 32</i>	FAVORABLE <i>m±σ (p)</i> <i>n = 16</i>	GLOBAL <i>m±σ</i> <i>n = 61</i>
PROTEINAS TOTALES (g/dl)		7.84 ± 1.43 (0.021)	9.36 ± 1.87 (0.021)	8.27 ± 1.73
ALBUMINA (g/dl)		2.72 ± 0.55 (0.000)	2.05 ± 0.52 (0.000)	2.38 ± 0.66
β-GLOBULINAS (g/dl)		No Significativo	2.53 ± 0.83 (0.020)	2.24 ± 0.68
γ-GLOBULINAS (g/dl)		2.22 ± 1.40 (0.004)	3.96 ± 2.15 (0.004)	2.84 ± 1.88
ALB/GLO		0.61 ± 0.27 (0.000)	0.30 ± 0.13 (0.000)	0.48 ± 0.27
GLOBULOS ROJOS (x10 ³ /mm ³)		6281.88 ± 1040.07 (0.001)	4993.75 ± 1164.53 (0.001)	5810.16 ± 1290.70
HEMATOCRITO (%)		43.82 ± 6.35 (0.003)	34.97 ± 7.81 (0.003)	40.83 ± 8.70
HEMOGLOBINA (g/dl)		14.41 ± 2.20 (0.003)	11.44 ± 2.74 (0.003)	13.40 ± 2.93
UREA (mg/dl)		36.97 ± 11.15 (0.011)	31.75 ± 12.31 (0.011)	48.98 ± 42.63
ALT (U/l)		22.32 ± 11.37 (0.020)	No Significativo	29.43 ± 28.30
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	MUY FAVORABLE % (p) <i>n = 32</i>	FAVORABLE % (p) <i>n = 16</i>	GLOBAL % <i>n = 61</i>
FASE	INICIAL	40.63 (0.000)	-	21.31
	ESTADO	-	87.50 (0.004)	57.38
C. CLINICO	ASINTOMATICO	25 (0.004)	-	13.11
INS. RENAL	NO	100 (0.001)	-	86.89
INS. HEPATICA	NO	100 (0.046)	-	93.44

Tabla P.III.B.1 - Asociaciones entre las respuestas terapéuticas a corto plazo muy favorable y favorable (evolución hacia la remisión) y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

Al comparar el porcentaje de remisión observado en este estudio (78.7% = 48/61) con el obtenido al emplear dosis similares de Glucantime® por vía IM (68.57% = 48/70), los resultados revelaron la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p = 0.2732$) (tabla P.III.B.2).

EVOLUCION A MEDIO PLAZO / TRATAMIENTO	REMISION SI <i>n (%)</i>	REMISION NO <i>n (%)</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z-IM	48 (68.6)	22 (31.4)	70
G1+Z-SC	48 (78.7)	13 (21.3)	61

$\chi^2 = 1.226$ g.l.:1 $p = 0.2732$

Tabla P.III.B.2 – Distribución y comparación del tipo de respuesta a medio plazo (remisión sí o no) en función del tratamiento recibido (IM o SC).

Del mismo modo, la distribución, en función de la fase de la enfermedad, de los casos con remisión tratados por vía SC (estudio prospectivo) no fue estadísticamente diferente de la observada cuando se empleó la vía IM (estudio retrospectivo), administrando dosis similares de Glucantime® (tabla P.III.B.3).

FASE / TRATAMIENTO	FASE I <i>n</i>	FASE E <i>n</i>	FASE A <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G-1/G-1+Z-IM	20	26	2	48
G-1+Z-SC	13	33	2	48
TOTAL	33	59	4	96

$\chi^2 = 2.3154$
gl.: 2
 $p = 0.31422$

Tabla P.III.B.3 – Distribución de los casos que alcanzaron la remisión en función de la fase de la enfermedad y del tratamiento recibido (IM o SC).

Como ya quedó definido en materiales y métodos, considerábamos la consecución de la remisión cuando se cumplían las tres condiciones siguientes: desaparición de los síntomas, normalización del proteinograma y reducción significativa del título de anticuerpos. Efectivamente, en la mayor parte de los casos así fue. Sin embargo, en un reducido número de animales no llegaron a cumplirse de una manera estricta estas tres premisas.

En lo que se refiere a la sintomatología, la uveítis (en dos casos) y las lesiones localizadas en la zona distal de los pabellones auriculares (en tres casos) fueron los síntomas más rebeldes al tratamiento, sin que se consiguiese una desaparición total de los mismos en el momento de la remisión. El proteinograma no llegó a normalizarse por completo en ciertos pacientes (dos casos) que presentaron una alteración persistente del metabolismo proteico, presumiblemente ocasionada por una afección orgánica (hepática) crónica, caracterizada por una hipoalbuminemia y un aumento de las β -globulinas. Asimismo, el proteinograma se normalizó después de la remisión en algunos de los perros que presentaron una ehrlichiosis concurrente (tres casos), como consecuencia de la persistencia de valores elevados de las β y γ -globulinas.

No se observó una caída significativa (al menos en dos diluciones) de la tasa de anticuerpos, en el momento de la remisión, en algunos animales que partieron con títulos bajos (4/5 con título inicial 1/200 y 4/9 con título inicial 1/400) y en un número reducido de casos con títulos $\geq 1/800$ (7/33). Sin embargo, a excepción de 3 casos (dos con título inicial 1/400 y uno con título inicial 1/200), el resto presentó una reducción significativa de la tasa de anticuerpos en el control inmediatamente posterior a la remisión.

En lo que se refiere al número de ciclos de tratamiento y como ya estaba previsto, en algunos casos se administró más de uno hasta alcanzar la remisión, quedando la media global en 1.31. La distribución del número de ciclos aplicados, en función de la fase de la enfermedad en que se encontraban los animales en el momento del diagnóstico, se recoge en la tabla P.III.B.4.

NUMERO DE CICLOS / FASE	1 CICLO <i>n</i>	2 CICLOS <i>n</i>	3 CICLOS <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
FASE I	13	0	0	13
FASE E	20	12	1	33
FASE A	1	1	0	2
TOTAL	34	13	1	48

Tabla P.III.B.4 – Distribución del número de ciclos administrados hasta la remisión en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

Al comparar el promedio de ciclos según fase, mediante la *t* de Student, se comprueba una diferencia significativa entre la fase inicial y la fase de estado ($p < 0.001$) (tabla P.III.B.5). La fase avanzada quedó excluida del estudio estadístico debido al reducido número de casos.

FASE / TRATAMIENTO	FASE I	FASE E	COMPARACION DE MEDIAS
G1+Z-SC	$m = 1$ $\sigma = 0$ $n = 13$	$m = 1.4242$ $\sigma = 0.56$ $n = 33$	$d = 0.4241$ $t = 4.3464$ $g.l.: 44$ $p = 0.00013$

Tabla P.III.B.5 – Comparación de las medias de ciclos administrados hasta la remisión en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el estudio anterior, observamos que el número de ciclos de Glucantime® hasta alcanzar la remisión, según fase de la enfermedad, fue independiente de su vía de administración (IM o SC), cuando se emplearon dosis similares del antimonial (tabla P.III.B.6).

TRATAMIENTO / FASE	G1/G1+Z-IM	G1+Z-SC	COMPARACION DE MEDIAS
FASE I	$m = 1.05$ $\sigma = 0.224$ $n = 20$	$m = 1$ $\sigma = 0$ $n = 13$	$d = 0.05$ $t = 0.80$ $g.l.: 31$ $p = 0.4296$
FASE E	$m = 1.4615$ $\sigma = 0.508$ $n = 26$	$m = 1.4242$ $\sigma = 0.56$ $n = 33$	$d = 0.0373$ $t = 0.264$ $g.l.: 57$ $p = 0.7924$

Tabla P.III.B.6 - Comparación de las medias de ciclos administrados hasta la remisión en función del tratamiento recibido (IM o SC) y de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

Quisimos comprobar si el número de ciclos, podía estar influido por otros factores (tabla P.III.B.7). La nula relación con algunos de ellos, como por ejemplo con la edad, ya había sido confirmada en el estudio anterior (pág. 116).

VARIABLE CUANTITATIVA		CICLOS <i>r</i>	<i>p</i>
PROTEINAS		0.406	0.002
ALBUMINA		-0.391	0.003
γ -GLOBULINAS		0.432	0.001
ALB/GLO		-0.451	0.001
GLOBULOS ROJOS		-0.433	0.001
HEMOGLOBINA		-0.477	0.000
HEMATOCRITO		-0.495	0.000
VARIABLE CUALITATIVA	MODALIDAD	CICLOS <i>m</i> ± <i>s</i> (<i>p</i>)	CICLOS GLOBAL <i>m</i> ± <i>s</i> <i>n</i> = 48
RESPUESTA A CORTO PLAZO	MUY FAVORABLE	1 (0.000) <i>n</i> = 32	1.31 ± 0.51
	FAVORABLE	1.94 ± 0.43 (0.000) <i>n</i> = 16	
FASE	INICIAL	1 (0.005) <i>n</i> = 13	
	ESTADO	1.42 ± 0.56 (0.012) <i>n</i> = 33	
CUADRO CLINICO	ASINTOMATICO	1 (0.029) <i>n</i> = 8	
	MIXTO	1.54 ± 0.50 (0.031) <i>n</i> = 13	

Tabla P.III.B.7 – Asociaciones entre el número de ciclos administrados hasta la remisión y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico.

En este estudio quedó, asimismo, patente la ausencia de asociación entre el número de ciclos y la edad o el sexo. Tampoco el peso de los perros en el momento de diagnóstico influyó significativamente en el número de ciclos de tratamiento administrados hasta alcanzar la remisión (tabla P.III.B.7), como así lo corrobora el test de χ^2 (tabla P.III.B.8).

CICLOS DE TRATAMIENTO/ PESO	1 CICLO <i>n</i>	> 1 CICLO <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
≤ 30 kg	26	9	35
> 30 kg	8	5	13
TOTAL	34	14	48

$\chi^2 = 0.2562$ g.l.: 1 *p* = 0.61274

Tabla P.III.B.8 – Distribución y comparación del número de ciclos administrados hasta la remisión en función del peso en el momento del diagnóstico.

Esta confirmación nos parecía especialmente interesante ya que las dosis máximas administradas fueron de 4500 mg de antimonio de meglumina (3 ampollas de Glucantime®) por perro y día, lo cual supondría que los perros por encima de 30 kg de peso recibieron dosis proporcionalmente inferiores del antimonial con respecto a aquellos con un peso, en el momento del diagnóstico, igual o menor a 30 kg. La ausencia de diferencias significativas entre el número de ciclos de tratamiento administrados hasta alcanzar la remisión y el peso permite integrar a todos estos perros en una población homogénea en cuanto a las dosis de fármaco recibidas.

Entre las demás variables estudiadas se comprueba, mediante análisis de varianza (ANOVA) y determinación de correlaciones, una dependencia entre el número de ciclos administrados hasta alcanzar la remisión y el cuadro clínico, las proteínas plasmáticas totales, las γ -globulinas, la albúmina, el cociente Alb/Glo, la hemoglobina, los glóbulos rojos y el hematocrito (tabla P.III.B.7), lo cual resulta lógico habida cuenta que la mayor parte de dichas variables fueron consideradas para establecer la fase de la enfermedad.

Puesto que, como se describió en materiales y métodos, entre los criterios considerados para decidir la consecución de la remisión, además del cuadro clínico, se veían necesariamente implicados algunos parámetros biopatológicos (título de anticuerpos y proteinograma), lógicamente, sus valores en el momento de la remisión debían ser diferentes a los valores iniciales. Quisimos, sin embargo, comprobar como evolucionaban, no sólo éstas sino también, el resto de las variables continuas consideradas en este estudio, comparando sus valores medios en el momento de la remisión con los observados en el diagnóstico. En esta comparación se consideraron los resultados obtenidos mediante el test de la t pareada y el test de Wilcoxon. Además, correlacionamos los valores iniciales y los valores obtenidos en el momento de la remisión. La tabla P.III.B.9 recoge este estudio.

Comprobamos cómo la mayor parte de los parámetros presentaron una evolución claramente tendente a la normalización y sus valores medios fueron significativamente diferentes en el momento de la remisión con respecto al momento inicial. Incluso, los parámetros que, en el diagnóstico, ostentaron alteraciones poco pronunciadas quedaron más centrados dentro del rango fisiológico, en el momento de la remisión, lo que evidencia la tendencia de todas estas variables a homogeneizar sus valores.

Salvo las cifras de α -globulinas, que permanecieron sin diferencias significativas, el resto de las fracciones del proteinograma, así como las proteínas totales y el cociente Alb/Glo, sufrieron modificaciones alcanzándose, en todos estos parámetros, valores medios fisiológicos en el momento de la remisión.

Cambios significativos sucedieron, igualmente, en los parámetros de la serie roja entre ambos momentos: el hematocrito, la concentración de hemoglobina y el recuento de glóbulos rojos aumentaron proporcionalmente en cada caso (como lo demuestra la alta correlación observada). Sin embargo, dentro de la serie blanca, al comparar el momento inicial y el de remisión, únicamente se detectaron incrementos significativos en el recuento de linfocitos y eosinófilos (éste último sólo por el test de Wilcoxon), permaneciendo los valores medios de glóbulos blancos, neutrófilos y monocitos estadísticamente inalterados. Conviene destacar la existencia de una alta correlación entre el valor medio linfocitario de ambos momentos, al contrario de lo que ocurre con los eosinófilos.

Por último, los niveles de urea permanecieron estabilizados en los animales que remitieron. Aunque se detectó un aumento significativo en las tasas de ALT tras la instauración del tratamiento sus valores medios se mantuvieron dentro del rango fisiológico. Destacamos cómo los valores de ambas variables mostraron una correlación altamente significativa al comparar los dos momentos considerados.

VARIABLE CUANTITATIVA	MOMENTO DIAGNOSTICO <i>m±σ</i>	MOMENTO REMISION <i>m±σ</i>	t Pareada P	Wilcoxon P	r (p)
TITULO RECIPROCO	2066.6667 ± 2269.6270	443.7500 ± 545.9351	0.0000	0.0000	0.6017 (0.0000)
PROTEINAS TOTALES (g/dl)	8.3479 ± 1.7597	6.9521 ± 0.7635	0.0000	0.0000	0.6442 (0.0000)
ALBUMINA (g/dl)	2.4967 ± 0.6344	3.1148 ± 0.4448	0.0000	0.0000	0.4357 (0.0018)
α-GLOBULINAS (g/dl)	0.7996 ± 0.2288	0.7746 ± 0.2168	0.5550	0.3302	0.1459 (0.3173)
β-GLOBULINAS (g/dl)	2.2571 ± 0.6806	1.8152 ± 0.4259	0.0001	0.0001	0.2246 (0.1210)
γ-GLOBULINAS (g/dl)	2.8006 ± 1.8974	1.2533 ± 0.5172	0.0000	0.0000	0.6448 (0.0000)
ALB/GLO	0.5067 ± 0.2749	0.8277 ± 0.1840	0.0000	0.0000	0.4657 (0.0008)
HEMATOCRITO (%)	40.8708 ± 8.1209	49.0354 ± 5.0827	0.0000	0.0000	0.3400 (0.0169)
HEMOGLOBINA (g/dl)	13.4187 ± 2.8041	15.8625 ± 1.6335	0.0000	0.0000	0.5267 (0.0001)
G. ROJOS (x10 ³ /mm ³)	5852.5000 ± 1254.8873	6962.7080 ± 760.3156	0.0000	0.0000	0.3694 (0.0091)
G. BLANCOS (/mm ³)	9604.1670 ± 3936.2991	10114.5859 ± 3150.2104	0.3924	0.3721	0.3481 (0.0143)
NEUTROFILOS (/mm ³)	6327.2080 ± 2779.3960	6246.5010 ± 2332.0354	0.8587	0.5938	0.2629 (0.0681)
LINFOCITOS (/mm ³)	2229.9788 ± 1637.7542	2681.2500 ± 1416.6909	0.0413	0.0234	0.5321 (0.0001)
EOSINOFILOS (/mm ³)	570.6458 ± 724.6564	751.1042 ± 658.3504	0.1804	0.0325	0.1186 (0.4173)
MONOCITOS (/mm ³)	471.3958 ± 402.4629	440.1250 ± 381.9053	0.6839	0.5858	0.0919 (0.5300)
UREA (mg/dl)	35.2292 ± 11.9311	36.1563 ± 10.8862	0.6026	0.3279	0.4262 (0.0023)
ALT (U/l)	25.2313 ± 19.4700	30.1875 ± 20.7853	0.0167	0.0069	0.7658 (0.0000)

Tabla P.III.B.9 – Comparación entre los valores medios de las distintas variables cuantitativas en el momento del diagnóstico y en el momento de la remisión (n = 48).

P.IV - EVOLUCION DE LOS CASOS QUE REMITIERON

De la misma forma que en el estudio retrospectivo, quisimos conocer la evolución a más largo plazo del grupo de perros que alcanzó la remisión aunque, evidentemente, en este caso los periodos máximos de seguimiento fueron inferiores puesto que, en este estudio prospectivo, el intervalo de tiempo definido para la recopilación de datos fue claramente más corto.

P.IV.A -. RECIDIVAS

De los 48 casos que alcanzaron la remisión, en 17 (35.4%) se constató la aparición de una recidiva durante el periodo de seguimiento, con un intervalo de tiempo medio de presentación de la misma, desde el momento del diagnóstico, de 13.94 meses y que, al igual que en el estudio retrospectivo, podría ajustarse a una distribución normal (tabla P.IV.A.1 y figura P.IV.A.a).

	m	σ	s_m	mínimo	máximo	n
T. RECIDIVA (meses)	13.7647	8.1894	1.9862	6	35	17
Diferencia máxima teórica:			0.286 ($p < 0.1$)	0.318 ($p < 0.05$)		
Diferencia máxima observada:			0.23236	(NO SIGNIFICATIVO)		
PERCENTILES			2.5% = 6.00	97.5% = 35.00		
			5% = 6.00	95% = 31.85		
			10% = 6.40	90% = 26.00		
			25% = 8.75	75% = 16.25		

Tabla P.IV.A.1 - Conformidad de la distribución del tiempo de recidiva con una curva de Gauss

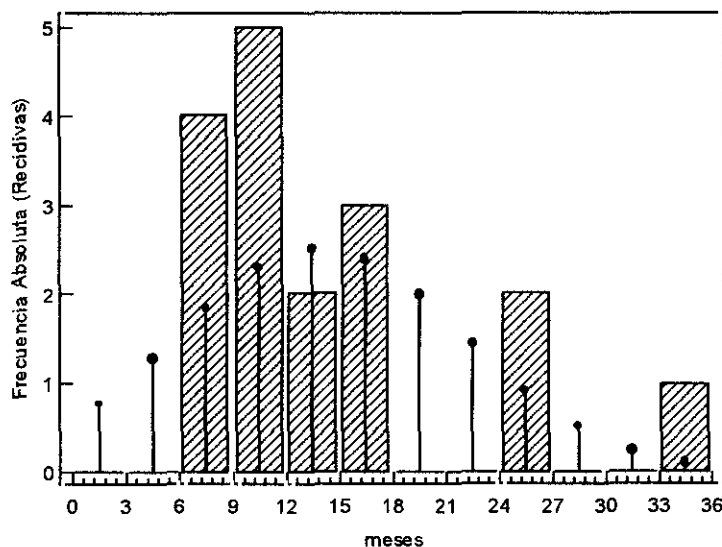


Fig P.IV.A.a – Distribución de los casos en función del tiempo de presentación de recidiva con una curva de Gauss

En principio, este porcentaje e intervalo de tiempo no difieren significativamente de los obtenidos en el estudio anterior, dentro del grupo de perros que recibió las mismas dosis de Glucantime® por vía IM (tabla P.IV.A.2 y P.IV.A.3).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	REMISION <i>n</i>	RECIDIVA SI <i>n</i> (%)	RECIDIVA NO <i>n</i> (%)
G1/G1+Z-IM	48	21 (43.7)	27 (56.3)
G1+Z-SC	48	17 (35.4)	31 (64.6)
TOTAL	96	38 (39.6)	58 (60.4)

$\chi^2 = 0.392$ g.l.: 1 $p = 0.5350$

Tabla P.IV.A.2 – Distribución y comparación del tipo de evolución a largo plazo (recidiva sí o no) en función del tratamiento recibido (IM o SC).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MAX y MIN DE RECIDIVA <i>meses</i>	TIEMPO MEDIO DE RECIDIVA <i>m ± s_m meses</i>	COMPARACION DE MEDIAS
G1/G1+Z-IM	21	5 27	13.6 ± 1.44 σ : 6.64	$d = 0.34$ $t = 0.143$
G1+Z-SC	17	6 35	13.94 ± 1.95 σ : 8.04	g.l.: 36 $p = 0.8872$

Tabla P.IV.A.3 – Distribución y comparación de los tiempos hasta la recidiva en función del tratamiento recibido (SC o IM).

Las tasas de recidiva así como los tiempos mínimos, máximos y medios hasta la presentación de las mismas, en función de la fase de la enfermedad, se recogen en las tablas P.IV.A.5 y P.IV.A.6. Con el propósito de efectuar las correspondientes comparaciones, en estas mismas tablas también figuran los resultados observados en el grupo de animales que recibió dosis similares de Glucantime® por vía IM (del estudio retrospectivo). Previamente se confirmó la ausencia de diferencias significativas, entre ambas poblaciones, en la distribución de los casos con recidiva según la fase de la enfermedad (Tabla P.IV.A.4).

FASE (RECIDIVA SI) / TRATAMIENTO	FASE I <i>n</i>	FASE E <i>n</i>	FASE A <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z-IM	5	15	1	21
G1+Z-SC	2	14	1	17
TOTAL	7	29	2	38

$\chi^2 = 0.90922$ g.l.: 2 $p = 0.6347$

Tabla P.IV.A.4 – Distribución y comparación de los casos con recidiva en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico y el tratamiento recibido (IM o SC).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	FASE	REMISION <i>n</i>	RECIDIVA SI <i>n (%)</i>	RECIDIVA NO <i>n (%)</i>	TEST χ^2
G1/G1+Z-IM	FASE I	20	5 (25.0)	15 (75.0)	$\chi^2 = 0.050$ g.l.: 1 $p = 0.8285$
G1+Z-SC	FASE I	13	2 (15.4)	11 (84.6)	
G1/G1+Z-IM	FASE E	26	15 (57.7)	11 (42.3)	$\chi^2 = 0.814$ g.l.: 1 $p = 0.3710$
G1+Z-SC	FASE E	33	14 (42.4)	19 (57.6)	
G1/G1+Z-IM	FASE A	2	1 (50.0)	1 (50.0)	
G1+Z-SC	FASE A	2	1 (50.0)	1 (50.0)	

Tabla P.IV.A.5 – Distribución y comparación del tipo de evolución a largo plazo (recidiva sí o no) en función del tratamiento recibido (SC o IM) y la fase de la enfermedad.

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	FASE	RECIDIVA <i>n</i>	RECIDIVA TIEMPO MAX y MIN <i>meses</i>	TIEMPO MEDIO DE RECIDIVA <i>m ± sm -meses</i>	COMPAR. DE MEDIAS
G1/G1+Z-IM	FASE I	5	7 21	15.6 ± 2.34 σ : 5.22	$d = 8.1$ $t = 2.032$ g.l.: 5 $p = 0.0978$
G1+Z-SC	FASE I	2	6 9	7.5 ± 1.50 σ : 2.12	
G1/G1+Z-IM	FASE E	15	5 25	12.0 ± 1.59 σ : 6.18	$d = 3.1$ $t = 1.140$ g.l.: 27 $p = 0.2642$
G1+Z-SC	FASE E	14	6 35	15.1 ± 2.23 σ : 8.37	
G1/G1+Z-IM	FASE A	1	27	27	
G1+Z-SC	FASE A	1	10	10	

Tabla P.IV.A.6 – Distribución y comparación de los tiempos hasta la recidiva en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico y del tratamiento recibido (SC o IM).

El estudio estadístico reveló unos resultados homogéneos, tanto para las tasas de recidiva como para los tiempos de presentación de las mismas dentro de cada fase, independientemente de la vía de administración del antimonial.

Se confirman, para la vía SC, los resultados previamente obtenidos para la vía IM. Así, se registraron unas tasas de recidiva casi significativamente mayores para los perros en fases de estado (14/33) que para los diagnosticados y tratados en fases iniciales de la enfermedad (2/13) ($\chi^2 = 2.727$; g.l.: 1; $p = 0.0991$), mientras que las diferencias observadas en los intervalos de tiempo transcurridos hasta la presentación de la recidiva no alcanzaron valores significativos ($d = 7.6$; $t = 1.243$; g.l.: 14; $p = 0.2341$).

P.IV.A.1 - CARACTERIZACION DE LA RECIDIVA

Al disponer de más datos en este estudio prospectivo nos propusimos, mediante análisis univariante, caracterizar la recidiva buscando sus posibles relaciones con el resto de las variables estudiadas considerando los valores de éstas tanto en el momento del diagnóstico como en el de remisión (tabla P.IV.A.1.1).

La existencia, con respecto a las medias de la población que alcanzó la remisión, de un cociente Alb/Glo más bajo y de valores más elevados de linfocitos, glóbulos blancos, eosinófilos y β -globulinas, en el momento del diagnóstico, se asoció de forma estadísticamente significativa con la aparición de la recidiva. En el momento de la remisión sólo se detectó una relación entre el recuento linfocitario y el hecho de que se produjera o no tal recidiva.

Destacamos la ausencia de relación entre la aparición o no de recidiva y las variables cualitativas. De entre éstas, tan sólo la fase de la enfermedad mostró una relación casi significativa, como quedó demostrado anteriormente (pág. 170).

MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO			
VARIABLE CUANTITATIVA	RECIDIVA SI $m \pm \sigma$ (p) n = 17	RECIDIVA NO $m \pm \sigma$ (p) n = 31	GLOBAL $m \pm \sigma$ n = 48
β -GLOBULINAS (g/dl)	2.48 \pm 0.84 (0.050)	2.14 \pm 0.53 (0.050)	2.26 \pm 0.67
ALB/GLO	0.41 \pm 0.21 (0.030)	0.56 \pm 0.28 (0.030)	0.51 \pm 0.27
GLOBULOS BLANCOS (/mm ³)	11658.82 \pm 3758.29 (0.004)	8477.42 \pm 3487.29 (0.004)	9604.17 \pm 3895.08
LINFOCITOS (/mm ³)	3225.24 \pm 2173.5 (0.001)	1684.19 \pm 796.80 (0.001)	2229.98 \pm 1620.60
EOSINOFILOS (/mm ³)	823.29 \pm 899.56 (0.037)	432.10 \pm 440.52 (0.037)	570.65 \pm 717.07
MOMENTO DE LA REMISION			
VARIABLE CUANTITATIVA	RECIDIVA SI % (p) n = 17	RECIDIVA NO % (p) n = 31	GLOBAL % n = 48
LINFOCITOS (/mm ³)	3275.06 \pm 1645.23 (0.016)	2355.61 \pm 1401.86 (0.016)	2681.25 \pm 1401.86

Tabla P.IV.A.1.1 – Asociaciones entre el tipo de evolución a largo plazo (recidiva sí o no) y las demás variables consideradas, en el momento del diagnóstico y en el momento de la remisión.

Los criterios que definían la presentación de una recidiva incluían, como se describe en materiales y métodos, además de la posible reaparición de sintomatología compatible con la enfermedad, la modificación de algunos parámetros biopatológicos, concretamente del título de anticuerpos y/o del proteinograma. No obstante, quisimos comprobar también qué sucedía con el resto de las variables, comparando sus valores en el momento de la recidiva con los obtenidos en el control inmediatamente anterior a ésta. Además, correlacionamos los valores obtenidos en estos dos momentos. La tabla P.IV.A.1.2 recoge este estudio.

El análisis de estos resultados puso en evidencia, como es lógico, un aumento en el título de anticuerpos así como el desarrollo de alteraciones en las proteínas plasmáticas, a excepción de las α -globulinas. A parte de estos parámetros, las variables del eritrograma, particularmente el hematocrito, reflejaron modificaciones significativas entre el momento anterior a la recidiva y el momento en que se detectó ésta.

VARIABLE CUANTITATIVA	MOMENTO PRE-RECIDIVA <i>m$\pm$$\sigma$</i>	MOMENTO RECIDIVA <i>m$\pm$$\sigma$</i>	t Pareada <i>p</i>	Wilcoxon <i>p</i>	<i>r</i> (<i>p</i>)
TITULO RECIPROCO	397.0588 \pm 225.3266	1623.5294 \pm 1571.4362	0.0058	0.0008	-0.0069 (0.9785)
PROTEINAS TOTALES (g/dl)	7.1588 \pm 0.6746	7.4471 \pm 0.9207	0.2623	0.4075	0.2066 (0.4116)
ALBUMINA (g/dl)	3.1447 \pm 0.4049	2.6294 \pm 0.5670	0.0005	0.0019	0.5390 (0.0218)
α -GLOBULINAS (g/dl)	0.8471 \pm 0.2330	0.8653 \pm 0.1955	0.7895	0.6700	0.1733 (0.4924)
β -GLOBULINAS (g/dl)	1.8465 \pm 0.3972	2.2435 \pm 0.5543	0.0232	0.0494	0.0905 (0.7214)
γ -GLOBULINAS (g/dl)	1.3735 \pm 0.4783	1.7300 \pm 0.5376	0.0037	0.0065	0.6420 (0.0044)
ALB/GLO	0.7941 \pm 0.1797	0.5482 \pm 0.1398	0.0003	0.0006	0.0583 (0.8186)
HEMATOCRITO (%)	48.3000 \pm 5.0687	45.3059 \pm 4.4488	0.0209	0.0312	0.4934 (0.0384)
HEMOGLOBINA ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	15.6824 \pm 2.0619	14.7059 \pm 1.7170	0.0656	0.0976	0.4308 (0.0755)
G. ROJOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6671.1763 \pm 836.7673	6330.5884 \pm 817.4385	0.1766	0.2558	0.2791 (0.2631)
G. BLANCOS ($/\text{mm}^3$)	10729.4121 \pm 3683.5383	10911.7646 \pm 2836.1248	0.7541	0.7763	0.7680 (0.0002)
NEUTROFILOS ($/\text{mm}^3$)	6664.2354 \pm 3039.2671	6954.5884 \pm 2512.5435	0.6406	0.6874	0.6039 (0.0084)
LINFOCITOS ($/\text{mm}^3$)	2628.8823 \pm 1575.6438	2916.4707 \pm 1421.9423	0.1458	0.1930	0.8711 (0.0000)
EOSINOFILOS ($/\text{mm}^3$)	831.1765 \pm 923.3970	605.7647 \pm 444.1277	0.2243	0.3560	0.6210 (0.0064)
MONOCITOS ($/\text{mm}^3$)	432.1765 \pm 414.4902	434.9412 \pm 398.9156	0.9819	0.8684	0.2640 (0.2909)
UREA (mg/dl)	39.0588 \pm 10.7962	44.5294 \pm 28.0783	0.3683	0.5890	0.5137 (0.0301)
ALT (U/l)	28.9412 \pm 23.2848	32.8235 \pm 24.7468	0.2125	0.2455	0.8700 (0.0000)

Tabla P.IV.A.1.2 – Comparación entre los valores de las variables cuantitativas en el momento de recidiva y en el momento inmediatamente anterior, en los perros que sufrieron recidiva ($n = 17$).

P.IV.B - PERIODOS DE REMISION

Treinta y uno (64.6%) de los 48 perros que alcanzaron la remisión permanecieron estabilizados a lo largo del tiempo de su seguimiento, que fue de un promedio de 17.71 meses. Evidentemente y puesto que el porcentaje de perros que no recidivó es el opuesto al de la población que sí sufrió recidiva, las tasas de permanencia en remisión no presentaron diferencias significativas entre los animales tratados por vía SC y aquellos que recibieron dosis semejantes de Glucantime® por vía IM, como quedó reflejado en la tabla P.IV.A.2. En lo que se refiere a los intervalos de tiempo de permanencia en remisión, tampoco éstos fueron estadísticamente diferentes cuando comparamos ambas vías de administración del antimonial (tabla P.IV.B.1).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	CASOS SIN RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MAX y MIN SIN RECIDIVA <i>meses</i>	TIEMPO MEDIO SIN RECIDIVA <i>m ± sm meses</i>	COMPARACION DE MEDIAS
G1/G1+Z-IM	27	3 68	19.22 ± 3.36 σ : 17.46	$d = 1.51$ $t = 0.432$
G1-Z-SC	31	5 36	17.71 ± 1.45 σ : 8.09	g.l.: 56 $p = 0.6677$

Tabla P.IV.B.1 – Distribución y comparación de los tiempos de seguimiento en remisión en función del tratamiento recibido (SC o IM).

Al igual que hicimos en el apartado anterior para la recidiva, confirmamos la ausencia de diferencias entre la distribución, según fase de la enfermedad, de los casos tratados por cada una de estas vías que se mantuvieron en remisión durante el periodo que fueron supervisados (tabla P.IV.B.2). Estos resultados nos permitieron comparar las tasas (tabla P.IV.A.5) y los tiempos medios (tabla P.IV.B.3) de permanencia en remisión entre estos dos grupos de perros (tratados por vía SC y tratados por vía IM), en función de la fase de la enfermedad.

FASE (RECIDIVA NO) / TRATAMIENTO	FASE I <i>n</i>	FASE E <i>n</i>	FASE A <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
G1/G1+Z-IM	15	11	1	27
G1-Z-SC	11	19	1	31
TOTAL	26	30	2	58

$$\chi^2 = 2.485 \quad \text{g.l.: 2} \quad p = 0.2887$$

Tabla P.IV.B.2 – Distribución y comparación de los casos sin recidiva en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico y del tratamiento recibido (IM o SC).

EVOLUCION A LARGO PLAZO / TRATAMIENTO	FASE	CASOS SIN RECIDIVA <i>n</i>	TIEMPO MAX y MIN SIN RECIDIVA <i>meses</i>	TIEMPO MEDIO SIN RECIDIVA <i>m ± sm meses</i>	COMPAR. DE MEDIAS
G1/G1+Z-IM	FASE I	15	3 43	18.7 ± 3.80 σ : 14.73	$d = 0.3$ $t = 0.062$
G1+Z-SC	FASE I	11	5 30	18.4 ± 2.25 σ : 7.47	g.l.: 24 $p = 0.9513$
G1/G1+Z-IM	FASE E	11	3 68	21.0 ± 6.55 σ : 21.74	$d = 3.6$ $t = 0.643$
G1+Z-SC	FASE E	19	6 36	17.4 ± 2.02 σ : 8.80	g.l.: 28 $p = 0.5256$
G1/G1+Z-IM	FASE A	1	8	8	
G1+Z-SC	FASE A	1	16	16	

Tabla P.IV.B.3 – Distribución y comparación de los tiempos de seguimiento en remisión en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico y del tratamiento recibido (IM o SC).

Lógicamente, el estudio estadístico de los porcentajes revela resultados en concordancia con los anteriormente citados para las recidivas. En este caso y dentro del grupo tratado por vía SC, el porcentaje de perros que se mantuvo en remisión fue casi significativamente mayor para el grupo diagnosticado en fases iniciales (11/13) que para el que inició el tratamiento en fases de estado (19/33) de la enfermedad ($\chi^2 = 2.727$; g.l.: 1; $p = 0.0991$).

Por otro lado, los tiempos medios de seguimiento de los perros sin recidiva pueden considerarse similares en función de la fase de la enfermedad, tanto dentro del tratamiento SC ($d = 1$, $t = 0.316$, g.l.: 28 y $p = 0.7543$) como cuando comparamos la vía SC con la IM (tabla P.IV.B.3).

Aunque los periodos de seguimiento fueron variables, los promedios de tiempo de los animales (de cada grupo) que permanecieron en remisión a lo largo de todo el periodo de estudio (tabla P.IV.B.1) superaron a los promedios de tiempo calculados para la presentación de recidivas (tabla P.IV.B.2).

Al igual que en el estudio anterior, nos propusimos calcular la curva de supervivencia (o de permanencia en remisión), en función del tiempo de seguimiento, para este grupo tratado por vía subcutánea y compararla con la obtenida con la población que recibió la estiboterapia intramuscularmente a dosis similares de Glucantime® (figura P.IV.B.a).

Tasas de Supervivencia (Permanencia en Remisión) Acumulativa (error estandar)					
MESES	GRUPO G1-Z-SC	GRUPO G1/G1+Z-IMZ	MESES	GRUPO G1+Z-SC	GRUPO G1/G1+Z-IM
3	-	-	23	-	-
4	-	-	24	-	0.423 (0.097)
5	-	0.976 (0.023)	25	-	0.381 (0.093)
6	0.957 (0.029)	0.925 (0.041)	26	0.484 (0.123)	-
7	-	0.872 (0.053)	27	-	0.338 (0.092)
8	0.912 (0.042)	0.846 (0.058)	28	-	-
9	0.866 (0.050)	0.817 (0.064)	29	-	-
10	0.843 (0.055)	0.761 (0.069)	30	-	-
11	0.795 (0.061)	-	32	-	-
12	0.745 (0.067)	0.702 (0.075)	33	-	-
13	-	0.672 (0.080)	34	-	-
14	-	-	35	0.242 (0.149)	-
15	0.714 (0.078)	-	36	-	-
16	0.682 (0.087)	0.571 (0.084)	17	-	-
17	0.646 (0.088)	0.538 (0.089)	43	-	-
18	-	0.504 (0.089)	64	-	-
20	-	-			
21	-	0.465 (0.094)			

Test de Comparación de Curvas de Supervivencia		
Mantel-Cox	$p=0.2973$	Tarone-Ware $p=0.2482$
		Breslow $p=0.2548$

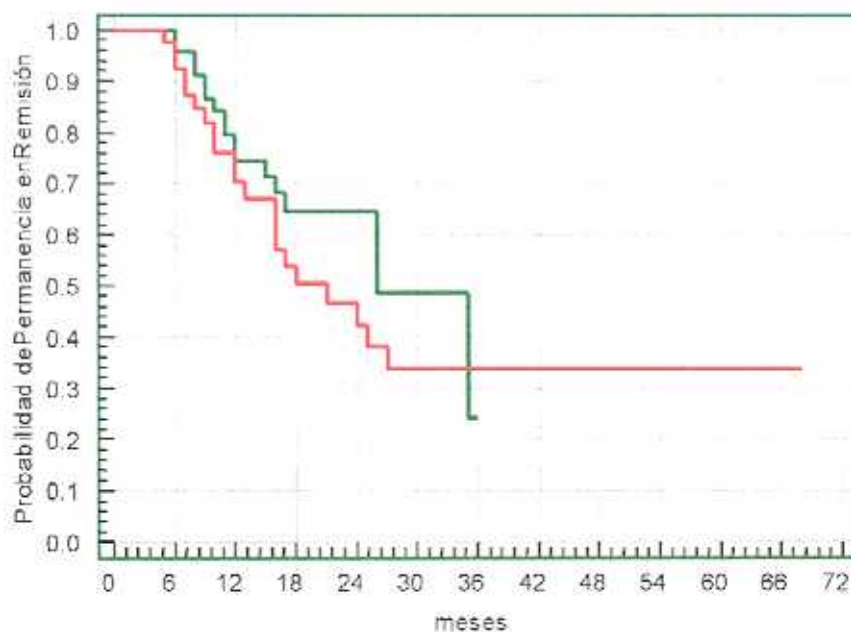
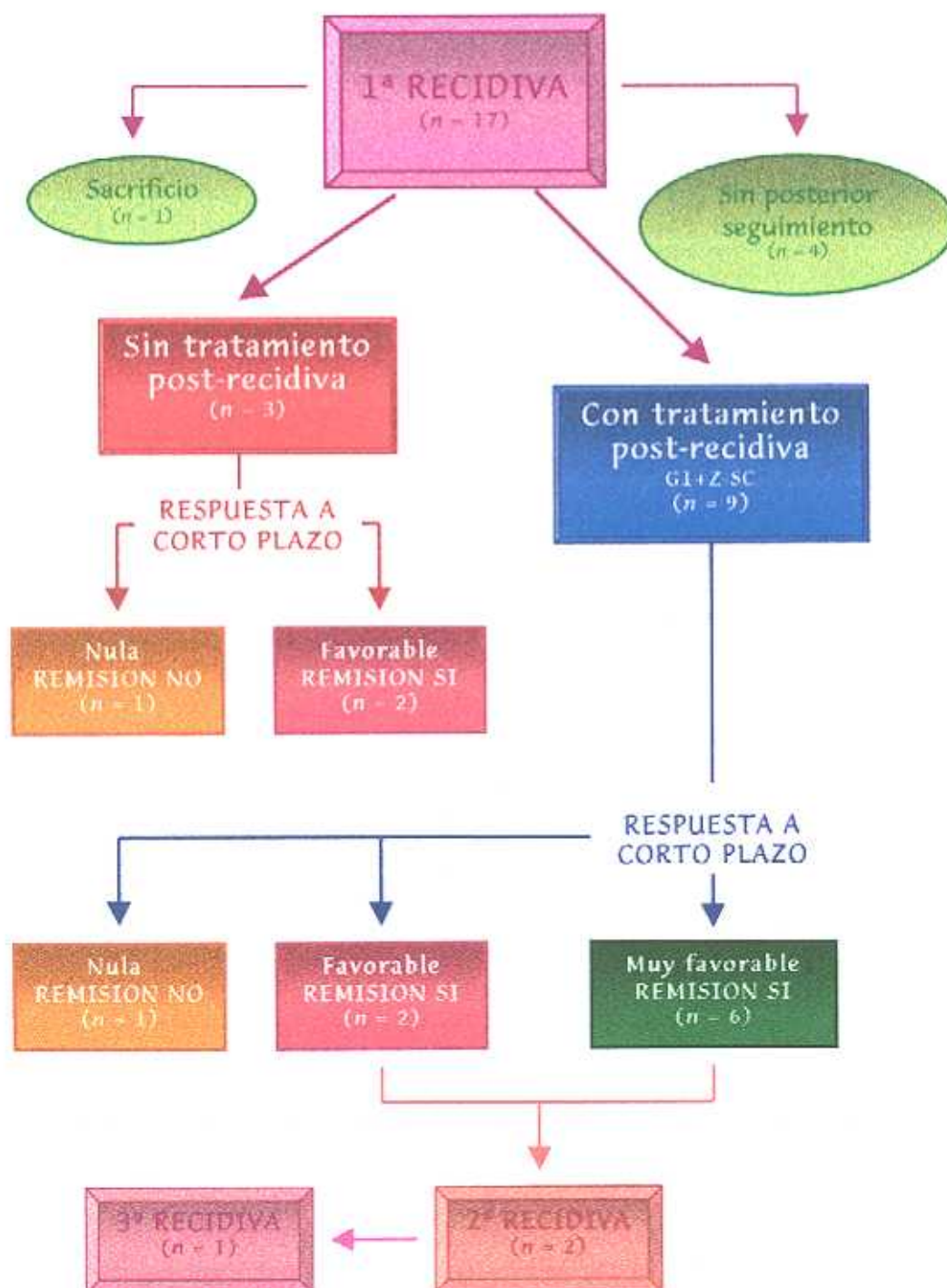


Fig P.IV.B.a – Estudio de supervivencia (permanencia en remisión), en función de la vía de administración: G1+Z-SC (línea) y G1/G1+Z-IM (línea).

La ausencia de diferencias significativas entre ambas distribuciones permite confirmar la similitud entre la eficacia terapéutica del Glucantime® administrado por vía IM y SC, en este caso considerando las tasas acumulativas de permanencia en remisión.

P.IV.C -. EVOLUCION DE LOS CASOS QUE PRESENTARON RECIDIVA

La evolución de los 17 casos que presentaron recidiva podría resumirse en el siguiente diagrama:



La evolución tan heterogénea de los animales incluidos en este apartado hizo imposible realizar un estudio de caracterización. No quisimos, sin embargo, concluir este capítulo sin describir la progresión de los pacientes con seguimiento tras la 1ª recidiva.

De los 9 pacientes que recibieron tratamiento (G1+Z-SC) tras esta 1ª recidiva, uno no llegó a remitir. A pesar de los numerosos ciclos de tratamiento instaurados a partir de este momento, que se acompañaron de una cierta mejoría, las recaídas se sucedieron (con una sintomatología cada vez más intensa), sin que el animal llegara remitir en ningún momento durante los dos años de supervisión .

Los otros ocho perros tratados alcanzaron la remisión. Dos de ellos presentaron una segunda recidiva 12 meses después de detectada la primera. El resto de estos animales permanecieron en remisión durante el tiempo que fueron controlados (3 casos durante 18 meses y los otros tres durante 7, 10 y 11 meses respectivamente).

Uno de los tres casos que no fueron sometidos a terapia cuando se detectó la 1ª recidiva, mostró un aumento en el título de anticuerpos y alteraciones en el proteinograma que fueron haciéndose cada vez más profundas durante los 7 meses que se dejó evolucionar al paciente. La aparición de sintomatología clara, tras este periodo de tiempo, persuadió al propietario de instaurar un nuevo ciclo de tratamiento, sin que dispongamos de historia posterior.

Los otros animales no tratados en el momento de la recidiva fueron dos perras en las que se detectó una ligera alteración del proteinograma y del título de anticuerpos con sintomatología escasa y poco intensa a los 6 y 9 meses de la primera recidiva respectivamente, coincidiendo en ambos casos con una gestación, por lo que no se consideró la aplicación de un tratamiento.

Una de las perras parió 12 cachorros, de los cuales 8 estaban muertos en el momento del parto y los cuatro que vivieron fueron testados al mes y medio dando una IFI negativa. En esta perra el título de anticuerpos descendió, el proteinograma se normalizó y desaparecieron los síntomas, sin recibir tratamiento alguno, tres meses después del parto y se mantuvo en remisión durante los siete meses de seguimiento posterior.

La otra perra tuvo una camada de 6 cachorros vivos y uno muerto. Aunque esta perra no fue controlada durante los 8 meses posteriores, la sintomatología desapareció permaneciendo, al menos aparentemente, en remisión durante este tiempo. La IFI realizada con el plasma de uno de estos cachorros, cuando tenía un año de edad, reveló la ausencia de anticuerpos frente a *L.infantum*. Una nueva gestación coincidió con la reagudización de los síntomas que, en esta vez, fueron mucho más generalizados e intensos. La analítica reveló una perturbación profunda del proteinograma y un aumento muy importante en el título de anticuerpos, por lo que la propietaria accedió a tratar de nuevo a la perra después de que ésta pariera 6 cachorros, de los cuales, uno estaba muerto.

P.V - EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS

Siguiendo la misma estructura que en el estudio retrospectivo, quisimos detallar la dinámica del título de anticuerpos y del cociente Alb/Glo en los animales que alcanzaron la remisión (48 perros), a lo largo del primer año de seguimiento, considerando sólo los controles previos a la recidiva en los casos en los que ésta se produjo antes de superar este periodo de tiempo.

Al disponer de un mayor número de datos (tanto de variables como de controles), nos fue posible describir y analizar la evolución de otros parámetros biopatológicos e, incluso, pudimos determinar la existencia o no de interacción entre las evoluciones de cada uno de estos parámetros en función de la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico, de la respuesta post-tratamiento observada a corto plazo y de la presentación o no de recidiva.

P.V.A -. EVOLUCION DEL TITULO DE ANTICUERPOS

Para calcular la posible ecuación que nos determinara la dinámica de anticuerpos, nuestra colección de datos fue distribuida en 6 grupos atendiendo al título inicial, tal y como se recoge en la tabla P.V.A.1. En dicha tabla se indican el número de casos y controles serológicos considerados para el estudio estadístico de cada grupo.

TRATAMIENTO (GRUPO)	TITULO INICIAL	CASOS <i>n</i>	CONTROLES <i>n</i>
G1+Z-SC (G1+Z-6400)	1/6400	10	37
G1+Z-SC (G1+Z-3200)	1/3200	5	18
G1+Z-SC (G1+Z-1600)	1/1600	7	34
G1+Z-SC (G1+Z-800)	1/800	11	45
G1+Z-SC (G1+Z-400)	1/400	9	37
G1+Z-SC (G1+Z-200)	1/200	6	25

Tabla P.V.A.1 - Distribución del número de casos y controles serológicos en función del título específico de anticuerpos en el momento del diagnóstico.

Al igual que en el estudio anterior, destacamos cómo los casos incluidos en éste presentaron un descenso progresivo en la evolución del título de anticuerpos anti-leishmania. Asimismo, en algunos casos, tras la instauración del tratamiento y previamente a este descenso, se observó una ligera elevación del título de anticuerpos (una dilución). En este estudio han sido ignorados estos aumentos inmediatos a la instauración del tratamiento.

Comprobamos, mediante análisis estadístico, que la relación título de anticuerpos/tiempo podría ser ajustada a distintos modelos de curvas, pero la que mostró unos coeficientes de correlación más elevados fue, para todos los grupos, la logarítmica ($y=a+blnx$) (tabla P.V.A.2). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio retrospectivo para el tratamiento con dosis similares de Glucantime® administrado por vía IM (G1/G1+Z), como vemos en las figuras P.V.A.a y P.V.A.b

GRUPO	ECUACION DE LA CURVA	$a \pm s$	$b \pm s$	r
G1+Z-6400	$y = a + b \ln x$	5935.4 ± 478.8	-939.4 ± 107.9	0.83
G1+Z-3200	$y = a + b \ln x$	3151.7 ± 180.1	-515.2 ± 41.6	0.95
G1+Z-1600	$y = a + b \ln x$	1612.1 ± 110.0	-229.1 ± 23.3	0.87
G1+Z-800	$y = a + b \ln x$	803.0 ± 45.3	-111.7 ± 10.1	0.86
G1+Z-400	$y = a + b \ln x$	408.6 ± 37.7	-41.1 ± 8.3	0.64
G1+Z-200	$y = a + b \ln x$	201.0 ± 20.8	-20.2 ± 4.6	0.68

Tabla P.V.A.2 - Valor de los coeficientes a y b de la ecuación de la cinética de anticuerpos que mostró el mayor coeficiente de correlación (r), para cada grupo considerado (y = título de anticuerpos recíproco; x = días).

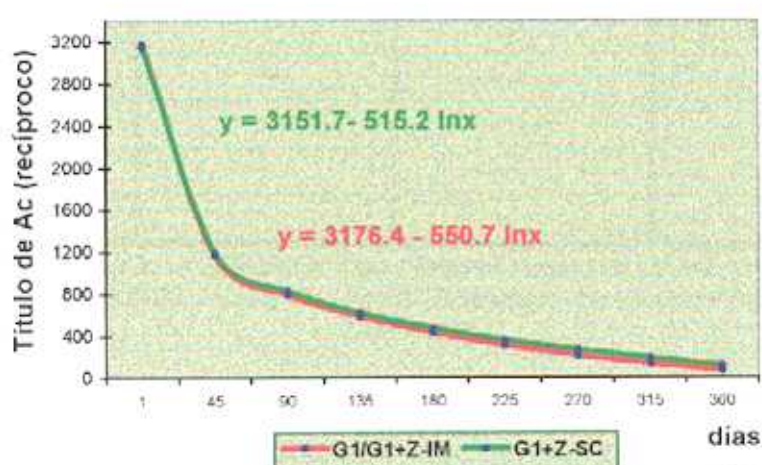


Fig P.V.A.a - Cinética del título de anticuerpos para los grupos G1-IM-3200 (tratados IM, con >100-150 mg de antimonio de meglumine y título inicial=1/3200) y G1+Z-SC-3200 (tratados SC, con 150 mg de antimonio de meglumine y título inicial=1/3200,)

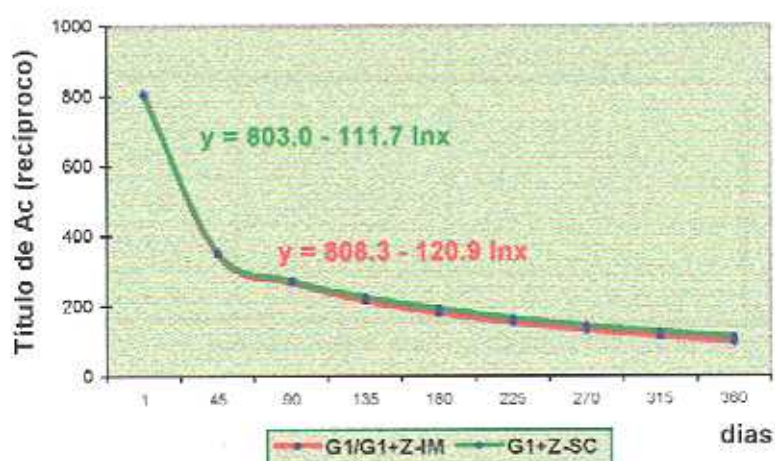


Fig P.V.A.a - Cinética del título de anticuerpos para los grupos G1-IM-800 (tratados IM, con >100-150 mg de antimonio de meglumine y título inicial=1/800) y G1+Z-SC-800 (tratados SC, con 150 mg de antimonio de meglumine y título inicial=1/800)

P.V.B - EVOLUCION DEL COCIENTE ALB/GLO

En el estudio estadístico sobre la evolución del proteinograma en el curso del tratamiento de la leishmaniosis canina los valores de los cocientes Alb/Glo observados en los controles efectuados a lo largo del tiempo establecido (1 año), sobre los 48 perros que evolucionaron hacia la remisión, fueron distribuidos, en función del cociente Alb/Glo obtenido de los distintos perros en el momento del diagnóstico, en 5 grupos, como se recoge en la tabla P.V.B.1.

TRATAMIENTO (GRUPO)	ALB/GLO INICIAL	CASOS <i>n</i>	CONTROLES <i>n</i>
G1+Z-SC (G1+Z-0.1)	< 0.20	5	24
G1+Z-SC (G1+Z-0.3)	0.2-0.39	17	59
G1+Z-SC (G1+Z-0.5)	0.4-0.59	10	41
G1+Z-SC (G1+Z-0.7)	0.6-0.79	9	41
G1+Z-SC (G1+Z-0.9)	> 0.79	7	31

Tabla P.V.B.1 - Distribución del número de casos y controles serológicos en función del tratamiento recibido (independientemente del empleo de Zyloric®) y del cociente Alb/Glo en el momento del diagnóstico.

El análisis estadístico demuestra que la evolución del cociente Alb/Glo se ajustó, con unos coeficientes de correlación significativos a una curva de tipo potencial ($y = ax^b$), excepto para el grupo con un cociente inicial ≥ 0.8 (tabla P.V.B.2).

GRUPO	ECUACION DE LA CURVA	$a \pm s$	$b \pm s$	<i>r</i>
G1+Z-0.1	$y = a x^b$	0.160 ± 0.121	0.274 ± 0.026	0.92
G1+Z-0.3	$y = a x^b$	0.289 ± 0.038	0.178 ± 0.015	0.84
G1+Z-0.5	$y = a x^b$	0.508 ± 0.077	0.102 ± 0.017	0.69
G1+Z-0.7	$y = a x^b$	0.701 ± 0.064	0.043 ± 0.014	0.45
G1+Z-0.9	$y = x/(b + ax)$	0.931 ± 0.045	0.0002 ± 0.0002	0.14

Tabla P.V.B.2 - Valor de los coeficientes a y b de la ecuación de la cinética del cociente Alb/Glo que mostró el mayor coeficiente de correlación (*r*), para cada grupo considerado (y=cociente Alb/Glo; x= días).

Estos resultados coinciden, como reflejan las figuras P.V.B.a y P.V.B.b con los obtenidos cuando el tratamiento se realizó con dosis similares de Glucantime® por vía intramuscular (G1/G1+Z).

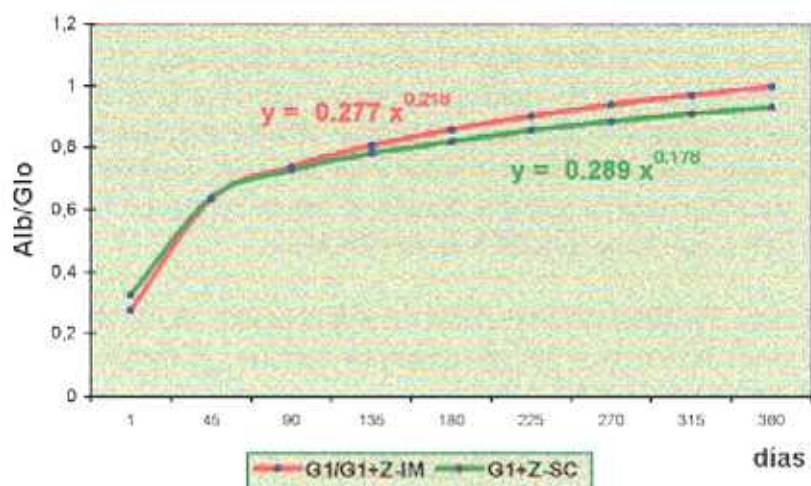


Fig P.V.B.a - Cinética del cociente Alb/Glo para los grupos G1-IM-0.3 (tratados IM, con >100-150 mg de antimonio de meglumine y Alb/Glo inicial=0.2-0.39) y G1+Z-SC-0.3 (tratados SC, con 150 mg de antimonio de meglumine y Alb/Glo inicial=0.2-0.39)

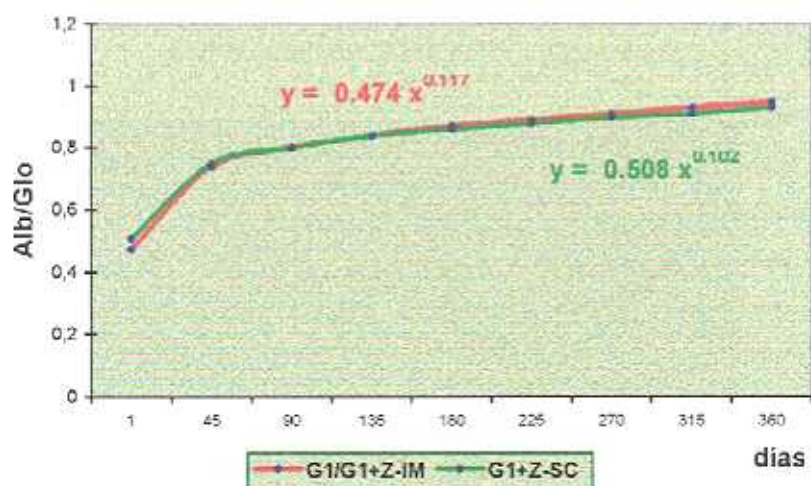


Fig P.V.B.b - Cinética del cociente Alb/Glo para los grupos G1-IM-0.5 (tratados IM, con >100-150 mg de antimonio de meglumine y Alb/Glo inicial=0.4-0.59) y G1+Z-SC-0.5 (tratados SC, con 150 mg de antimonio de meglumine y Alb/Glo inicial=0.4-0.59)

P.V.C -. EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS EN FUNCION DE DISTINTAS VARIABLES NOMINALES

Antes de entrar a estudiar la dinámica de los distintos parámetros considerados en función de la fase de la enfermedad en el momento de diagnóstico, de la respuesta a corto plazo y de la presentación o no de recidiva, decidimos examinar la evolución de los valores medios de dichos parámetros a lo largo del primer año de seguimiento (figuras P.V.C.a-P.V.C.p). Estos valores fueron obtenidos a partir de 26 casos, controlados trimestralmente, que alcanzaron y mantuvieron la remisión durante al menos 12 meses. De los 48 perros que alcanzaron la remisión quedaron excluidos de este estudio:

- los casos que presentaron recidiva durante el primer año de seguimiento ($n = 11$)
- los casos en los que, aun sin presentar recidiva, el tiempo de supervisión fue inferior a 1 año ($n = 6$)
- los casos en los que, aun superando el año de seguimiento sin presentar recidiva, faltó alguno de los controles trimestrales ($n = 5$)

Estos mismos casos fueron utilizados para estudiar la dinámica de los parámetros biopatológicos en función de la fase de la enfermedad y de la respuesta a corto plazo.

Fig P.V.C.a - TITULO DE ANTICUERPOS

$n = 26$

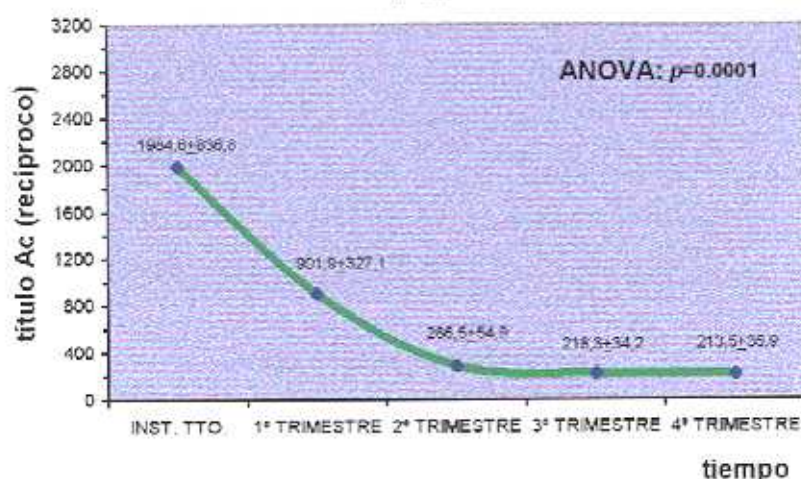


Fig P.V.C.b - PROTEINAS TOTALES $n = 26$

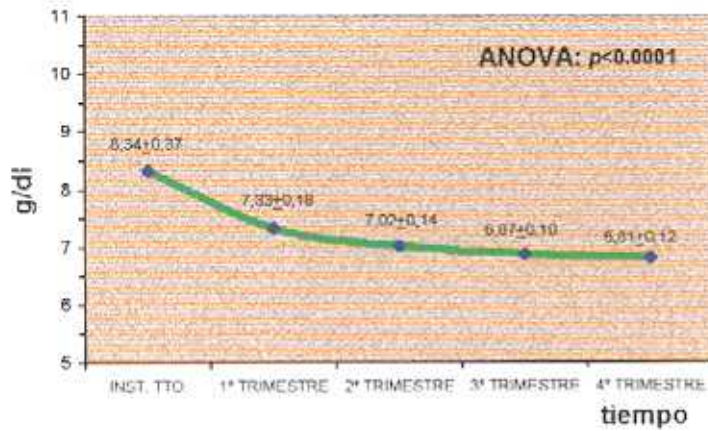


Fig P.V.C.c - ALBUMINA $n = 26$

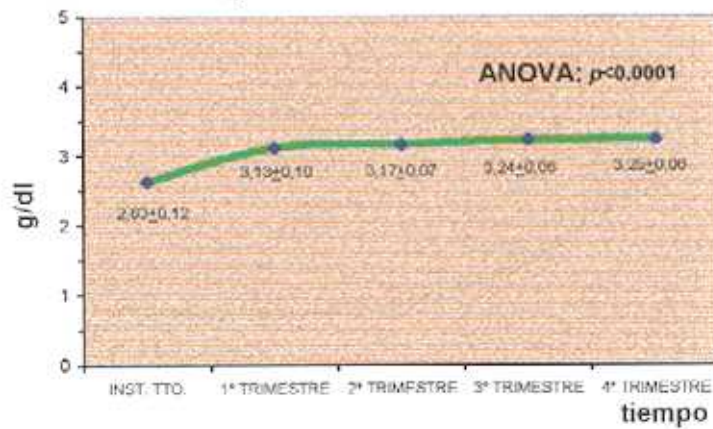


Fig P.V.C.d - ALFA-GLOBULINAS $n = 26$

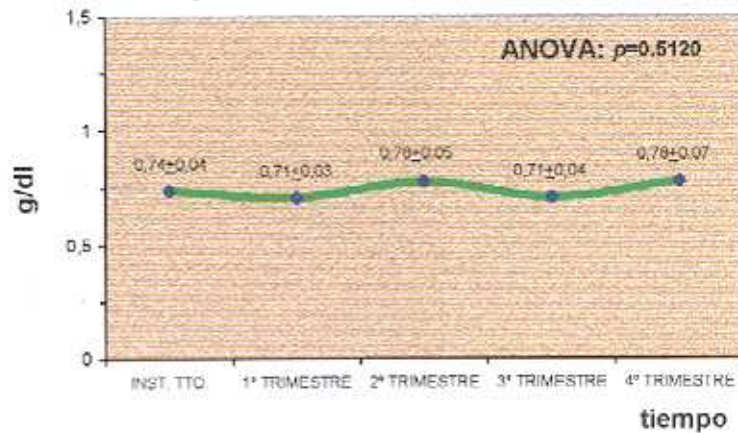


Fig P.V.C.e - BETA-GLOBULINAS $n = 26$

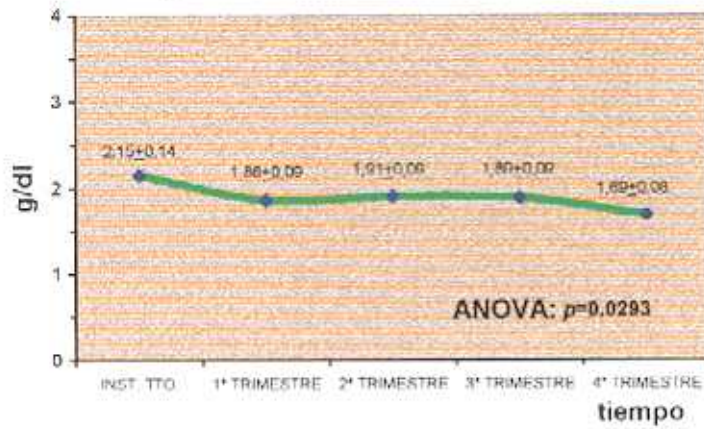


Fig P.V.C.f - GAMMA-GLOBULINAS $n = 26$

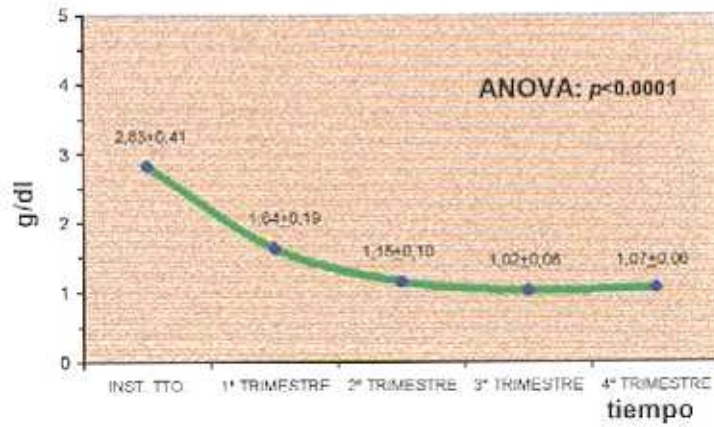


Fig P.V.C.g - ALB/GLO $n = 26$

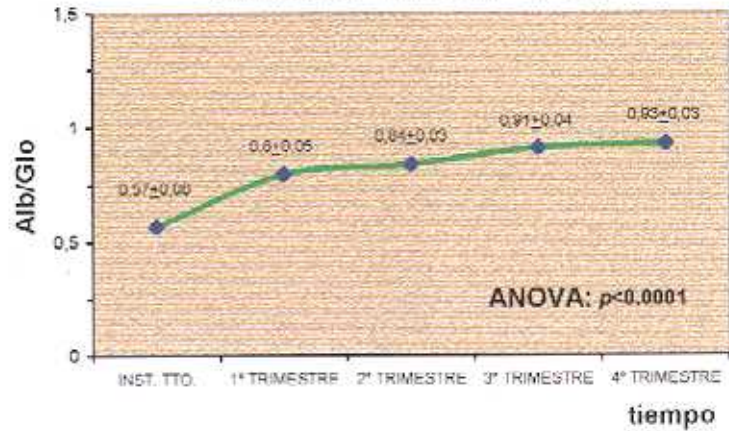


Fig P.V.C.h - HEMOGLOBINA $n = 26$

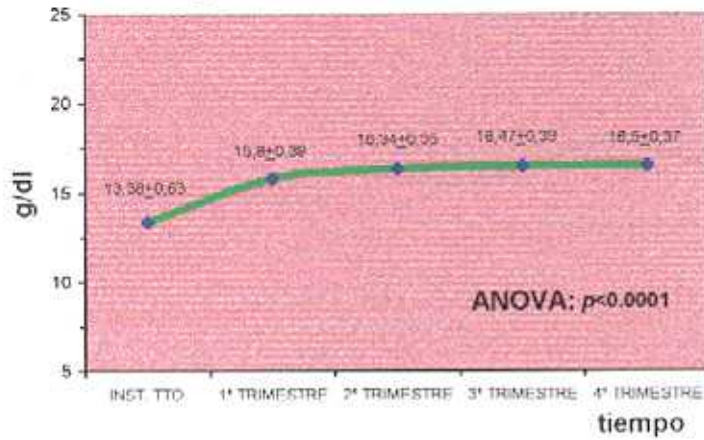


Fig P.V.C.i - HEMATOCRITO $n = 26$

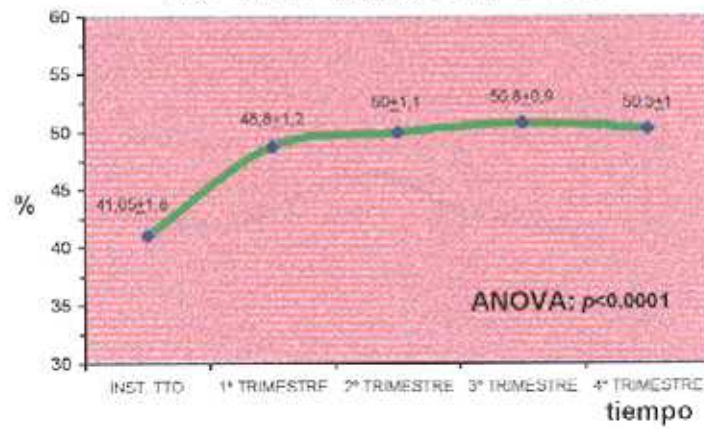


Fig P.V.C.j - GLOBULOS ROJOS $n = 26$

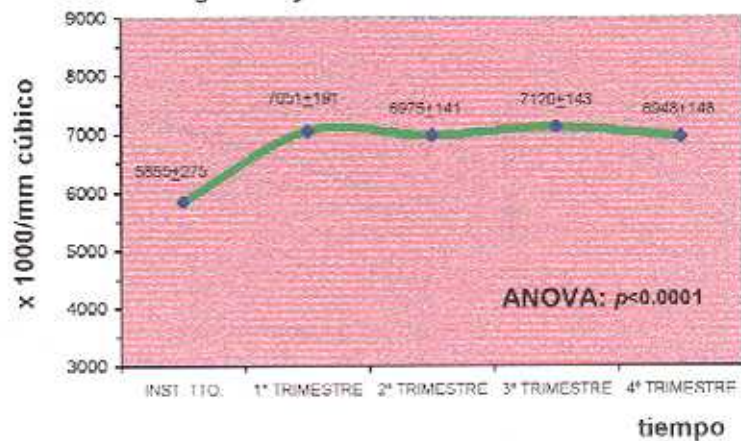


Fig P.V.C.k - GLOBULOS BLANCOS $n = 26$

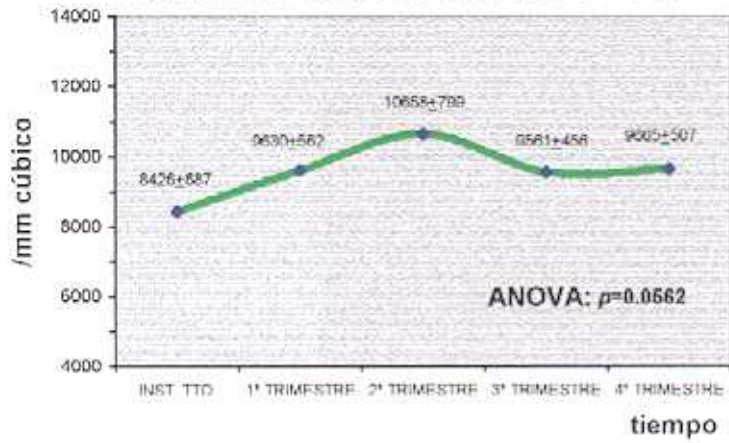


Fig P.V.C.I - NEUTROFILOS $n = 26$

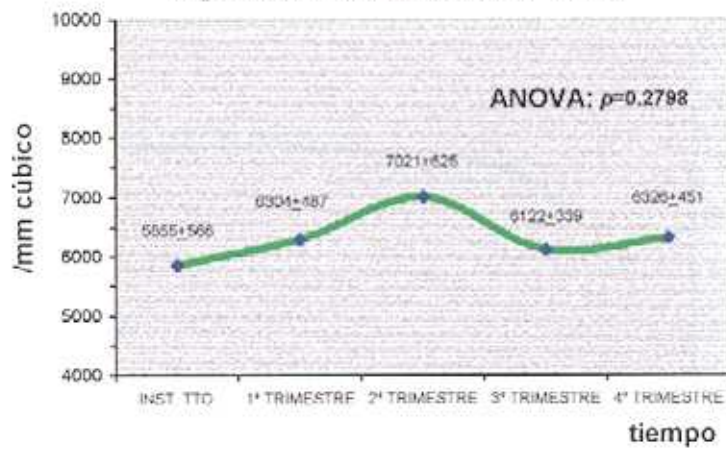


Fig P.V.C.m - LINFOCITOS $n = 26$

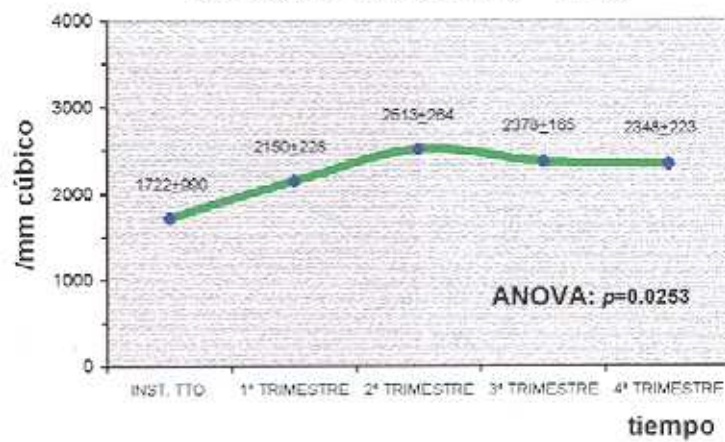


Fig P.V.C.n - MONOCITOS $n = 26$

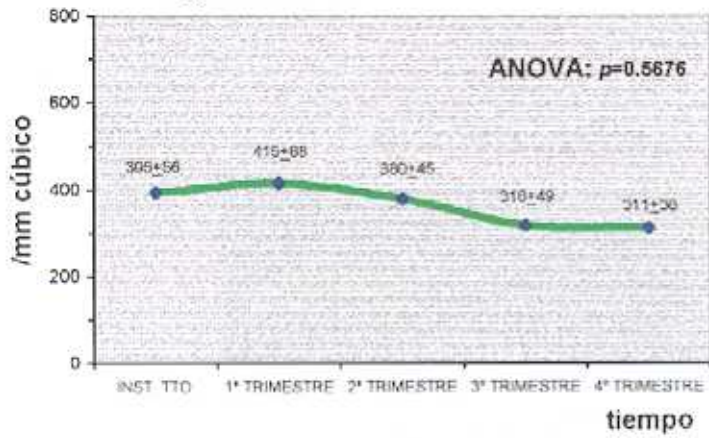


Fig P.V.C.ñ - EOSINOFILOS $n = 26$

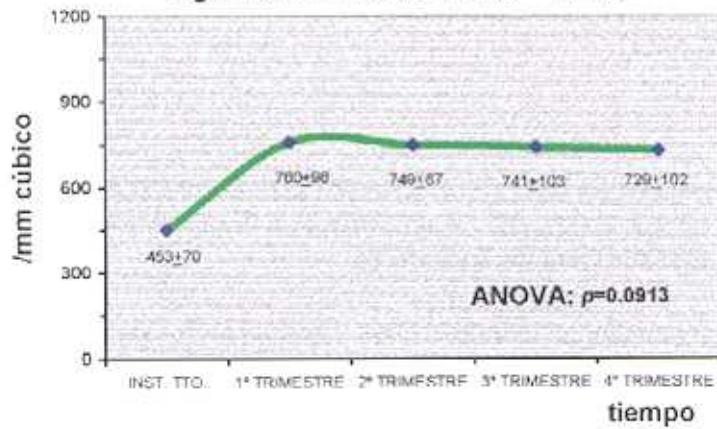


Fig P.V.C.o - UREA $n = 26$

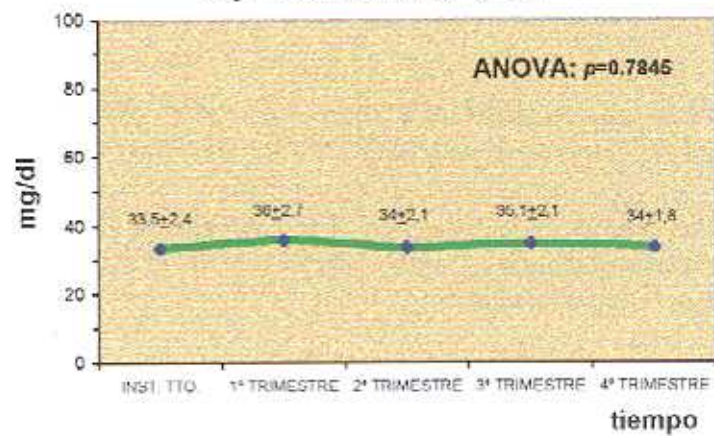
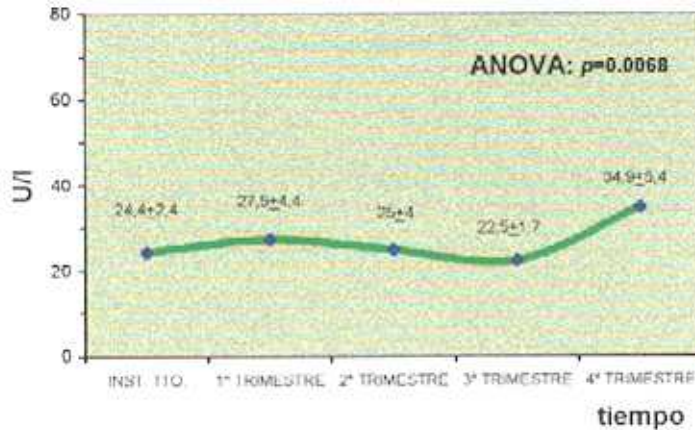


Fig P.V.C.p - ALT $n = 26$



P.V.C.1 - EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS EN FUNCION DE LA FASE, DE LA RESPUESTA A CORTO PLAZO Y DE LA PRESENTACIÓN O NO DE RECIDIVA

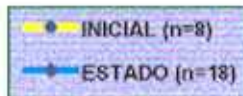
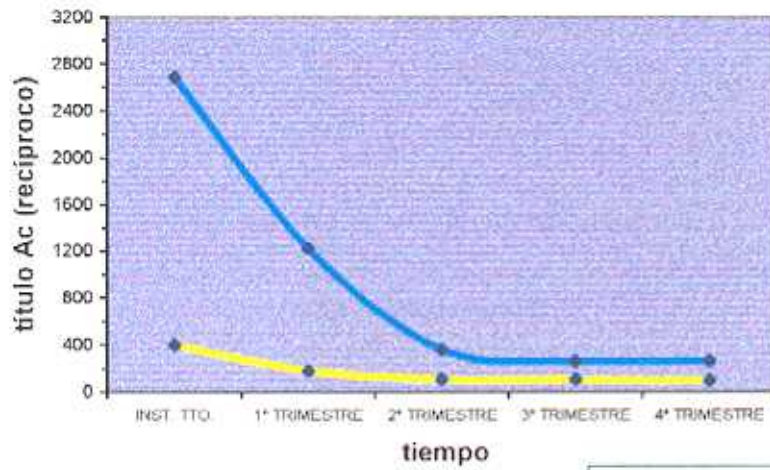
Una vez determinadas las curvas de los valores medios de las distintas variables cuantitativas a lo largo de un año, en los pacientes que alcanzaron y mantuvieron la remisión durante este periodo, quisimos profundizar un poco más, separando estos mismos casos ($n = 26$) y controles en distintos grupos en función de la fase de la enfermedad en que se encontraban estos perros en el momento del diagnóstico y en función del tipo de respuesta terapéutica a corto plazo.

Con respecto a la fase de la enfermedad, los animales fueron distribuidos en dos poblaciones, según se hallaran en fases iniciales (FASE I - $n = 8$) o en fase de estado (FASE E - $n = 18$).

En lo que se refiere a la respuesta a corto plazo, los animales se distribuyeron según ésta hubicra sido favorable (FAV - $n = 9$) o muy favorable (MUY FAV - $n = 17$).

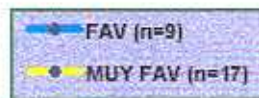
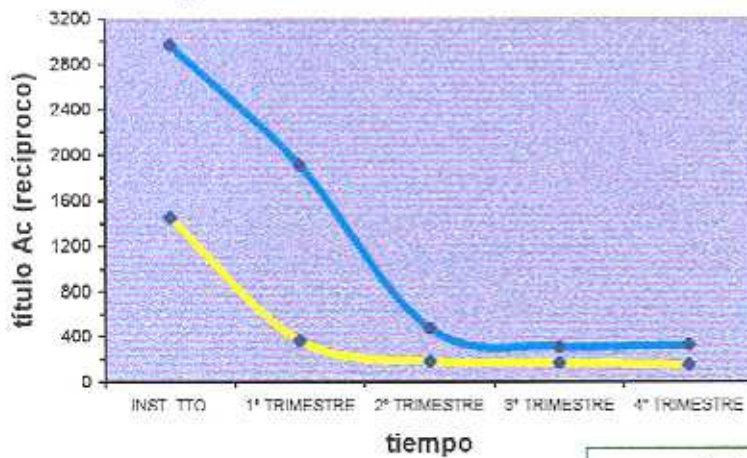
Las figuras IV.C.1.a - IV.C.1.p y las figuras IV.C.1.a' - IV.C.1.p' muestran las curvas obtenidas para las variables continuas en función de la fase y de la respuesta a corto plazo, respectivamente.

Fig P.V.C.1.a - TITULO DE ANTICUERPOS



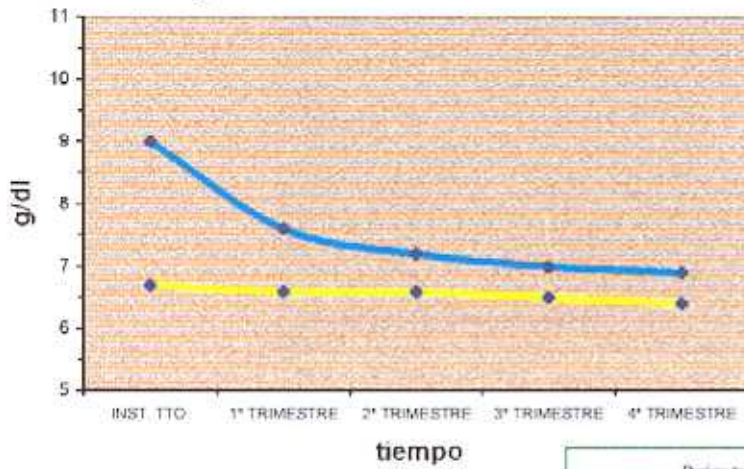
Parámetro: TITULO DE ANTICUERPOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	3609821.9	1	13.46	0.0012
Sexo	16869006.5	1	6.29	0.0193
1 Residual	2681416.6	24		
Tiempo	7606981.3	4	6.94	0.0001
Interacción	46961115.9	4	4.28	0.0031
2 Residual	1096393.8	96		

Fig P.V.C.1.a' - TITULO DE ANTICUERPOS



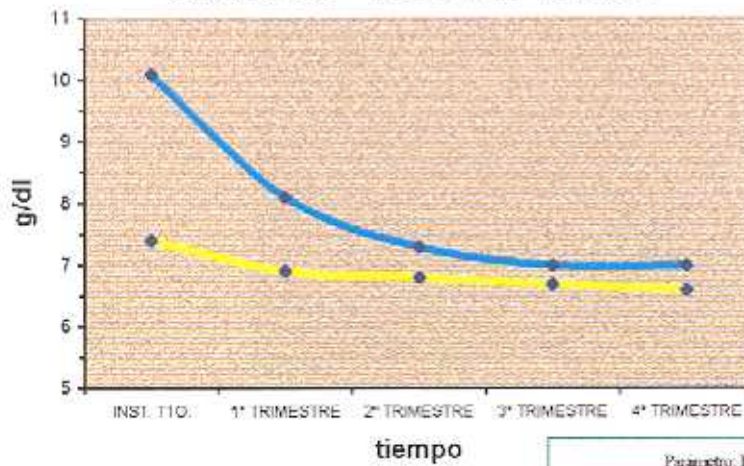
Parámetro: TITULO DE ANTICUERPOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	81798090.8	1	30.00	0.0000
Respuesta	15793475.4	1	5.79	0.0241
1 Residual	2726230.4	24		
Tiempo	17468170.8	4	15.04	0.0000
Interacción	3143890.0	4	2.71	0.0347
2 Residual	1161069.9	96		

Fig P.V.C.1.b - PROTEINAS TOTALES



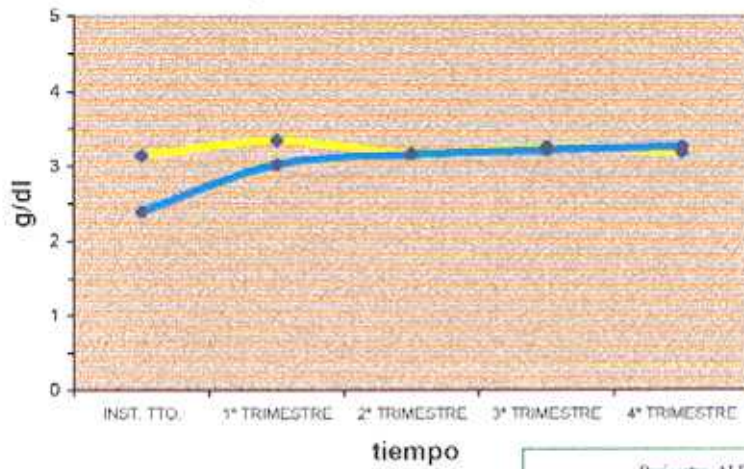
Parámetro: PROTEINAS TOTALES				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	5566.6	1	2553.55	0.0000
Fase	25.15	1	11.54	0.0024
1 Residual	2.18	24		
tiempo	5.19	4	9.73	0.0000
Interacción	3.17	4	5.94	0.0003
2 Residual	0.933	96		

Fig P.V.C.1.b' - PROTEINAS TOTALES



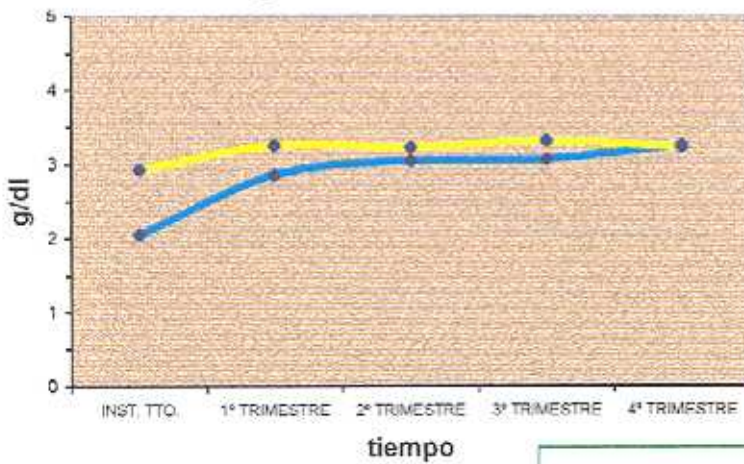
Parámetro: PROTEINAS TOTALES				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	6505.3	1	3401.75	0.0000
Respuesta	32.76	1	17.38	0.0003
1 Residual	1.863	24		
tiempo	14.45	4	34.72	0.0000
Interacción	5.988	4	11.39	0.0000
2 Residual	0.416	96		

Fig P.V.C.1.c - ALBUMINA



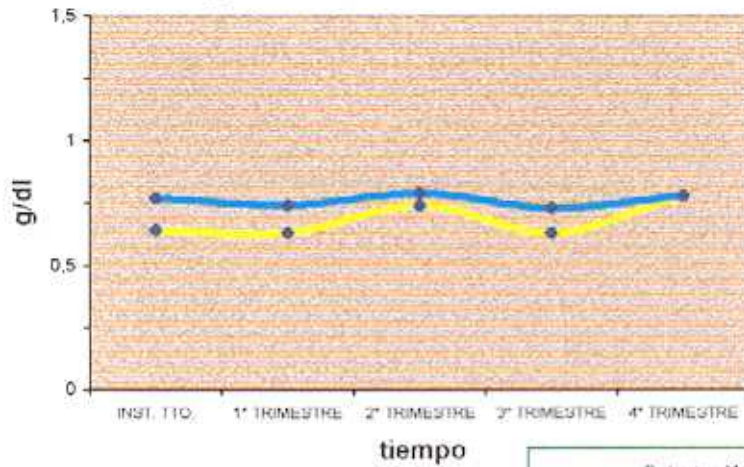
Parámetro: ALBUMINA				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	1080.9	1	2184.97	0.0000
Tiempo	1.218	1	2.46	0.1297
1 Residual	0.495	24		
Tiempo	0.254	4	3.87	0.0000
Interacción	0.634	4	6.38	0.0001
2 Residual	0.096	96		

Fig P.V.C.1.c' - ALBUMINA



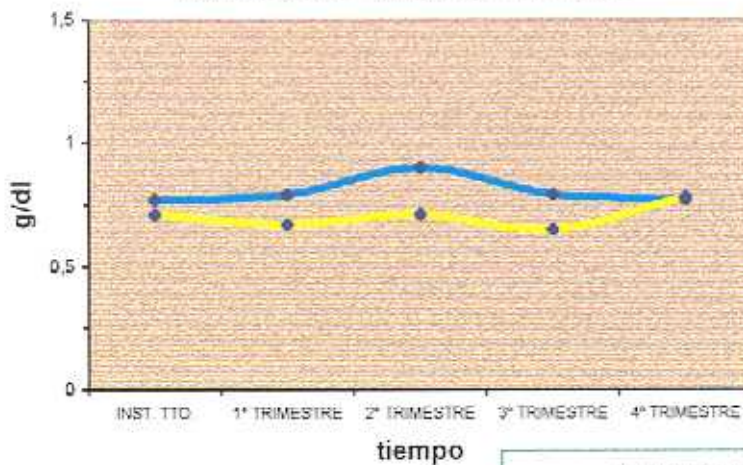
Parámetro: ALBUMINA				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	1082.1	1	2647.75	0.0000
Respuesta	3.284	1	8.03	0.0092
1 Residual	0.409	21		
Tiempo	2.213	4	23.64	0.0000
Interacción	0.686	4	7.33	0.0002
Residual	0.094	96		

Fig P.V.C.1.d - ALFA-GLOBULINAS



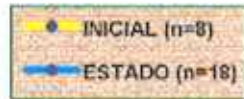
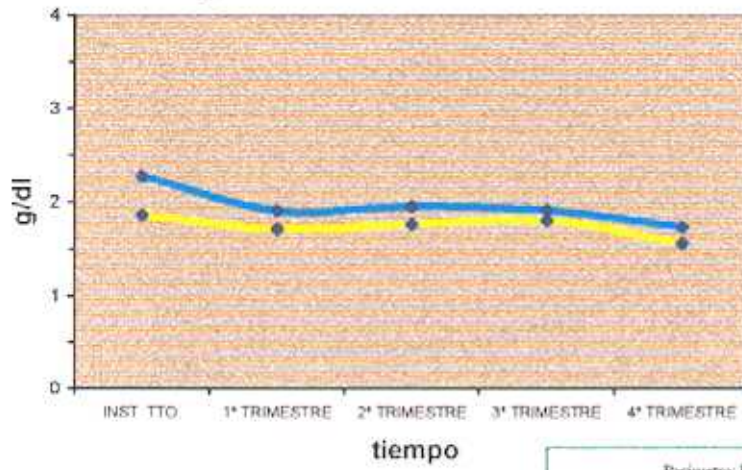
Parámetro: ALFA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	58.66	1	513.76	0.0000
Fase	0.179	1	1.57	0.2221
1 Residual	0.114	24		
Tiempo	0.044	4	1.00	0.4120
Interacción	0.015	4	0.33	0.8543
2 Residual	0.051	96		

Fig P.V.C.1.d' - ALFA-GLOBULINAS



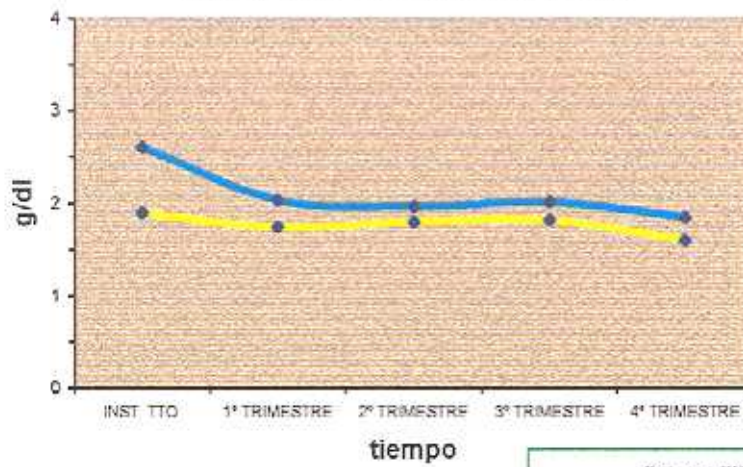
Parámetro: ALFA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	67.566	1	609.57	0.0000
Respuesta	0.260	1	2.34	0.1389
1 Residual	0.111	24		
Tiempo	0.029	4	0.67	0.6120
Interacción	0.034	4	0.79	0.5316
2 Residual	0.043	96		

Fig P.V.C.1.e - BETA-GLOBULINAS



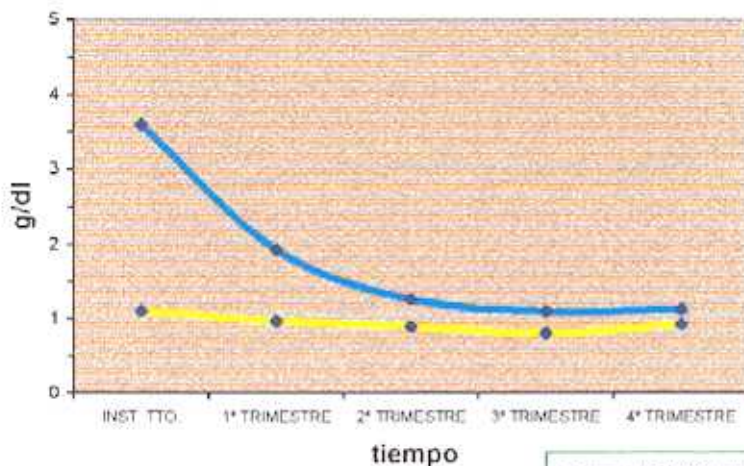
Parametro: BETA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	382.34	1	600.47	0.0000
Time	1.300	1	2.04	0.1661
1 Residual	0.637	24		
Time	0.494	4	2.82	0.0293
Interacción	0.076	4	0.43	0.7839
2 Residual	0.175	96		

Fig P.V.C.1.e' - BETA-GLOBULINAS



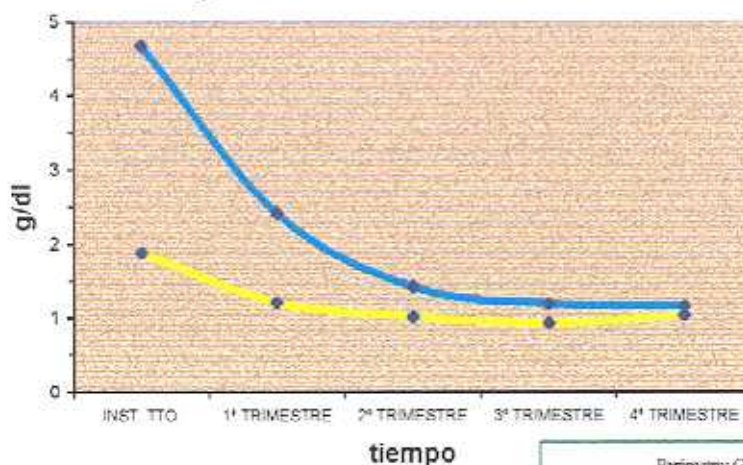
Parametro: BETA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	446.90	1	772.85	0.0000
Respuesta	2.849	1	4.97	0.0354
1 Residual	0.573	24		
Time	0.826	4	5.37	0.0006
Interacción	0.324	4	1.96	0.1068
2 Residual	0.165	96		

Fig P.V.C.1.f - GAMMA-GLOBULINAS



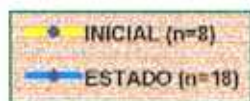
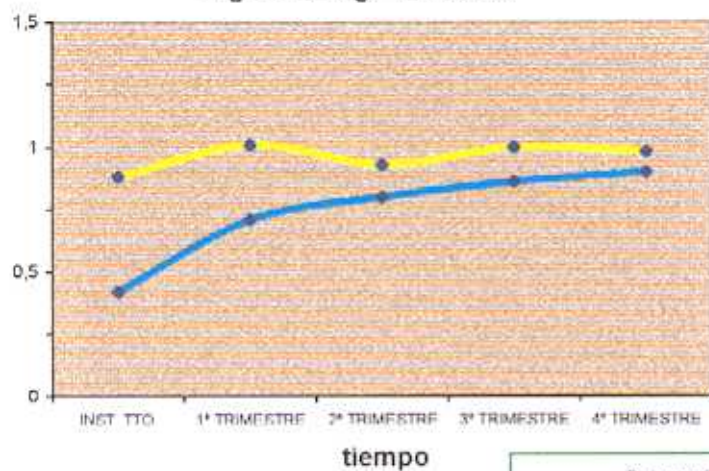
Parámetro: GAMMA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL	F	SIGNIF.
Media	210.64	1	107.17	0.0000
Ejec	20.69	1	10.53	0.0034
1 Residual	1.965	24		
1 tiempo	7.368	4	12.54	0.0000
Interacción	5.007	4	8.51	0.0000
2 Residual	0.518	96		

Fig P.V.C.1f - GAMMA-GLOBULINAS



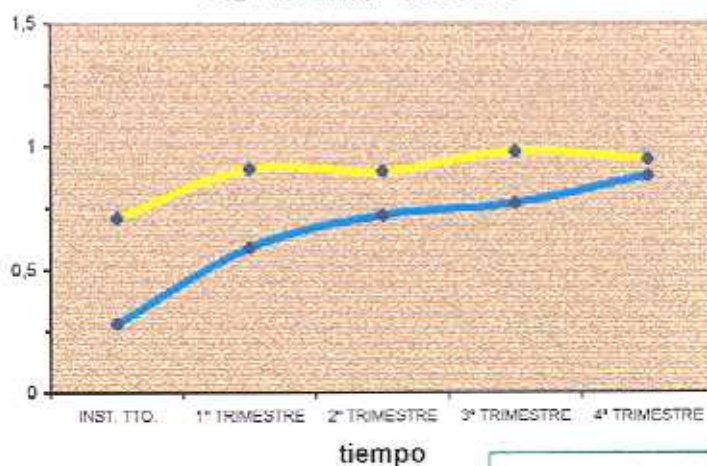
Parámetro: GAMMA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL	F	SIGNIF.
Media	337.91	1	201.77	0.0000
Resposta	27.67	1	16.52	0.0004
1 Residual	1.674	24		
Tiempo	20.43	4	42.06	0.0000
Interacción	7.458	4	15.35	0.0000
2 Residual	0.486	96		

Fig P.V.C.1.g - ALB/GLO



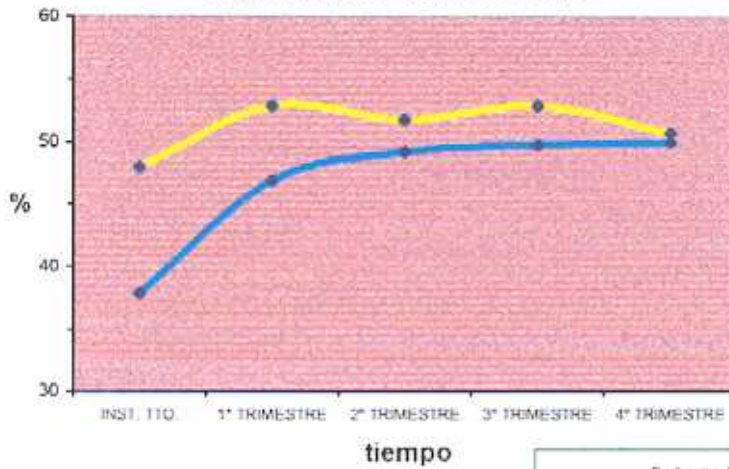
Parámetro: COCIENTE ALB/GLO				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	30.77	1	835.16	0.0000
Fase	1.366	1	14.11	0.0010
1 Residual	0.097	21		
Tiempo	0.306	4	15.00	0.0000
Interacción	0.137	4	6.71	0.0001
2 Residual	0.020	96		

Fig P.V.C.1.g' - ALB/GLO



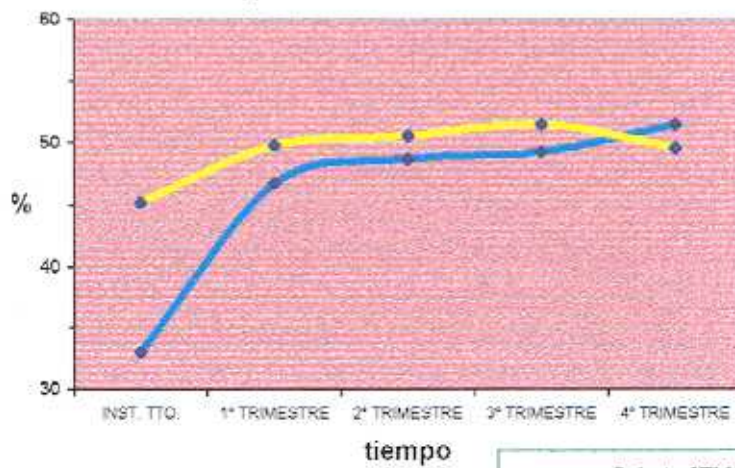
Parámetro: COCIENTE ALB/GLO				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	70.45	1	871.70	0.0000
Respuesta	1.750	1	21.68	0.0001
1 Residual	0.081	24		
Tiempo	0.046	4	30.20	0.0000
Interacción	0.113	4	5.31	0.0007
2 Residual	0.021	96		

Fig P.V.C.1.h - HEMATOCRITO



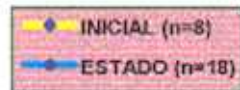
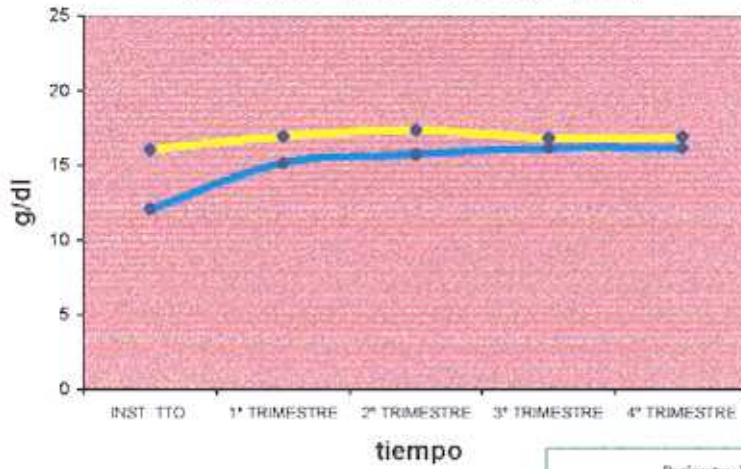
Parámetro: HEMATOCRITO				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	266566.4	1	3366.91	0.0000
Fase	532.8	1	6.98	0.0143
1 Residual	79.17	24		
Tiempo	260.2	4	12.06	0.0000
Interacción	74.33	4	3.44	0.0112
2 Residual	21.58	96		

Fig P.V.C.1.h' - HEMATOCRITO



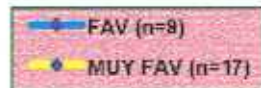
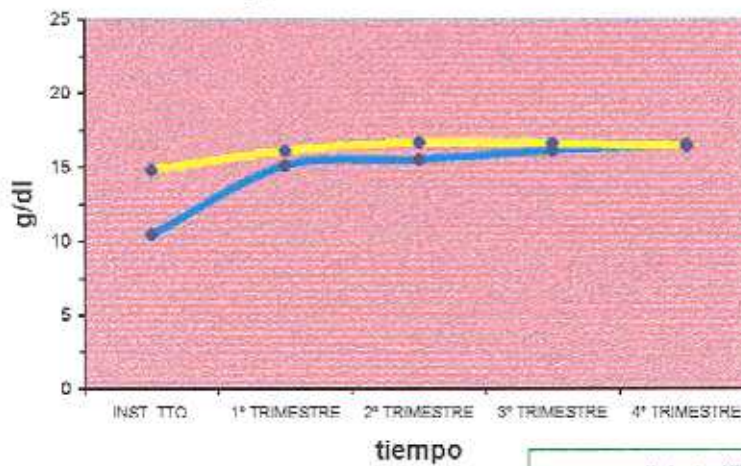
Parámetro: HEMATOCRITO				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	267295.6	1	3069.73	0.0000
Respuesta	363.1	1	4.17	0.0523
1 Residual	87.07	24		
Tiempo	548.4	4	30.30	0.0000
Interacción	160.7	4	8.94	0.0000
2 Residual	17.98	96		

Fig V.C.1.i - HEMOGLOBINA (n=26)



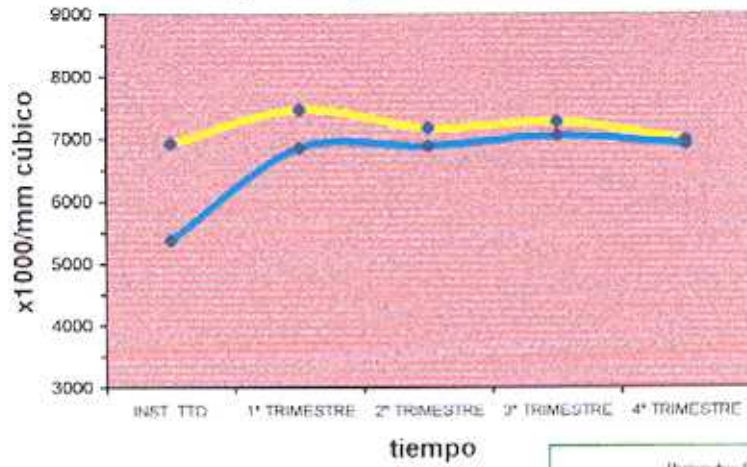
Parámetro: HEMOGLOBINA				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	28472.2	1	2402.53	0.0000
Pase	86.77	1	7.38	0.0126
1 Residual	11.83	24		
Tiempo	25.74	4	12.72	0.0000
Interacción	9.652	4	4.77	0.0015
2 Residual	2.023	96		

Fig V.C.1.i' - HEMOGLOBINA



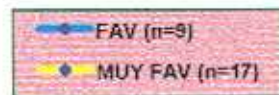
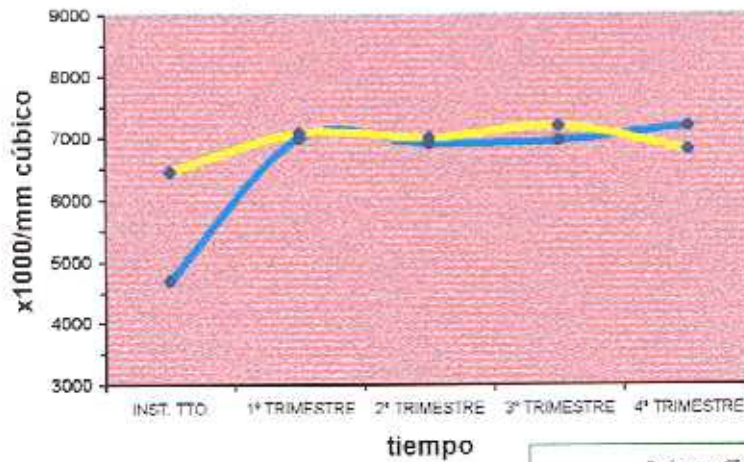
Parámetro: HEMOGLOBINA				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	28201.9	1	2154.58	0.0000
Respuesta	56.54	1	4.32	0.0483
1 Residual	13.09	24		
Tiempo	38.34	4	33.77	0.0000
Interacción	16.74	4	9.69	0.0000
2 Residual	1.73	96		

Fig P.V.C.1.j - GLOBULOS ROJOS



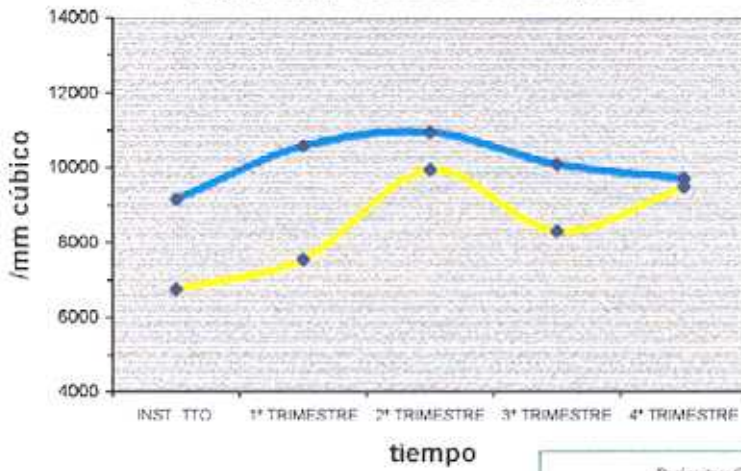
Parámetro: GLOBULOS ROJOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	5268.095x10 ³	1	2546.23	0.0000
Fase	8483x10 ³	1	4.10	0.0541
1 Residual	2069x10 ³	24		
Tiempo	3986x10 ³	4	8.06	0.0000
Interacción	1957x10 ³	4	3.96	0.0051
2 Residual	494.7x10 ³	96		

Fig P.V.C.1.j' - GLOBULOS ROJOS



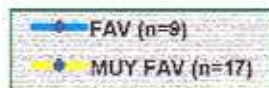
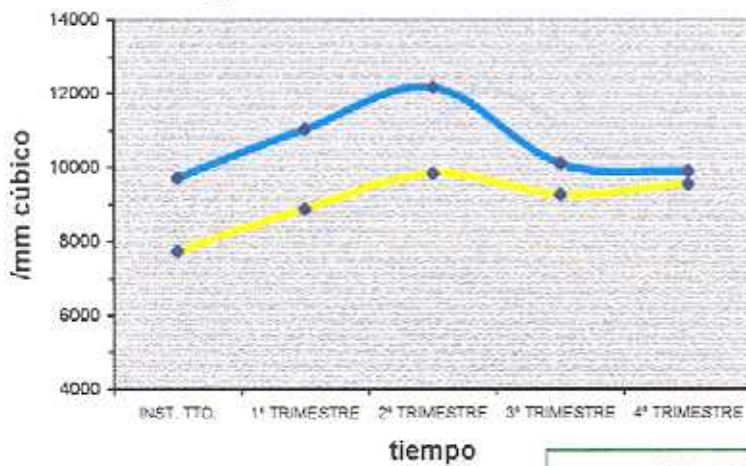
Parámetro: GLOBULOS ROJOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	5337.637x10 ³	1	2359.60	0.0000
Respuesta	3850.1x10 ³	1	1.70	0.2044
1 Residual	2262.1x10 ³	24		
Tiempo	9786.1x10 ³	4	23.74	0.0000
Interacción	3938.2x10 ³	4	9.56	0.0000
2 Residual	412.2x10 ³	96		

Fig V.C.1.k - GLOBULOS BLANCOS



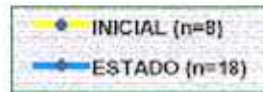
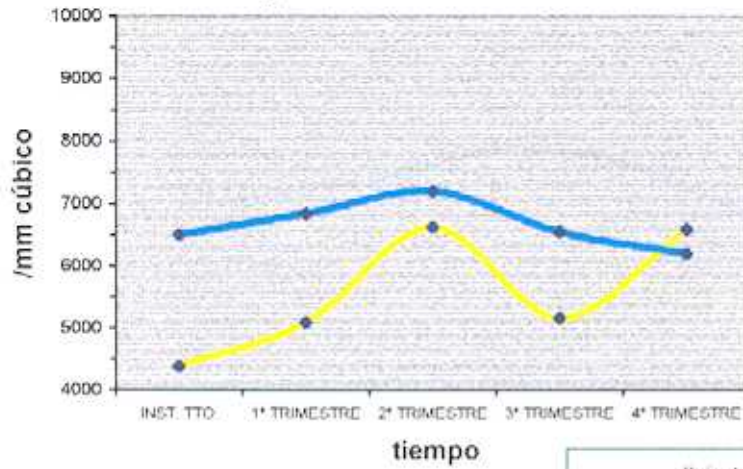
Parámetro: GLOBULOS BLANCOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	9509075×10^3	1	511.79	0.0000
Pase	78210×10^3	1	4.21	0.0513
1 Residual	18580×10^3	24		
Tiempo	18245×10^3	4	2.58	0.0422
Interacción	6591×10^3	4	0.93	0.4191
2 Residual	7076×10^3	96		

Fig P.V.C.1.k' - GLOBULOS BLANCOS



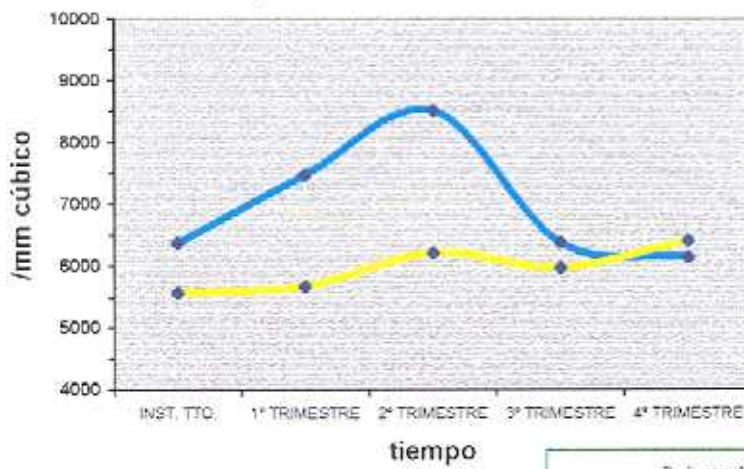
Parámetro: GLOBULOS BLANCOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	11355752×10^3	1	597.86	0.0000
Respuesta	68272×10^3	1	3.59	0.0701
1 Residual	18991×10^3	24		
Tiempo	15738×10^3	4	2.70	0.0750
Interacción	4614.2×10^3	4	0.64	0.6320
2 Residual	7158.1×10^3	96		

Fig P.V.C.1.I - NEUTROFILOS



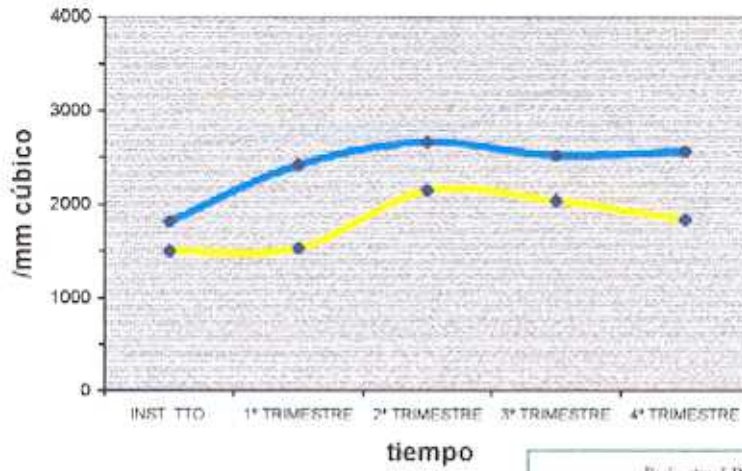
Parámetro: NEUTROFILOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	4144457×10^3	1	391,34	0,0000
Fase	32739×10^3	1	3,09	0,0915
1 Residual	10590×10^3	24		
Tiempo	6907×10^3	4	1,29	0,2800
Interacción	3559×10^3	4	1,04	0,3923
2 Residual	5361×10^3	96		

Fig P.V.C.1.I' - NEUTROFILOS



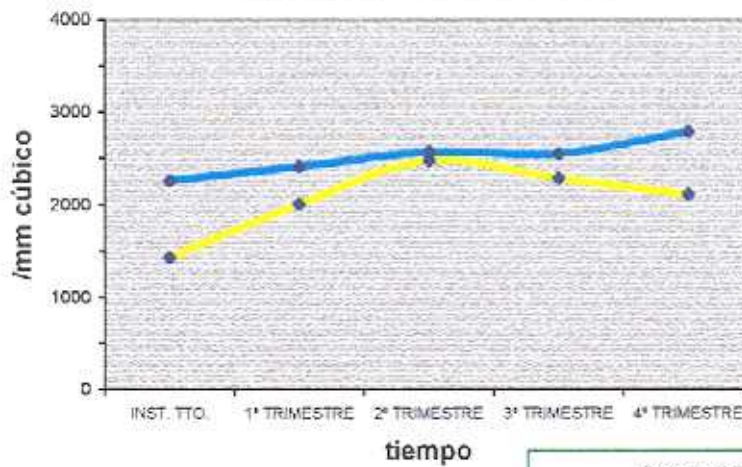
Parámetro: NEUTROFILOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	4963108×10^3	1	461,56	0,0000
Respuesta	29869×10^3	1	2,79	0,1079
1 Residual	10710×10^3	24		
Tiempo	$6980,7 \times 10^3$	4	1,31	0,2718
Interacción	$6322,7 \times 10^3$	4	1,19	0,3217
2 Residual	$5329,2 \times 10^3$	96		

Fig P.V.C.1.m - LINFOCITOS



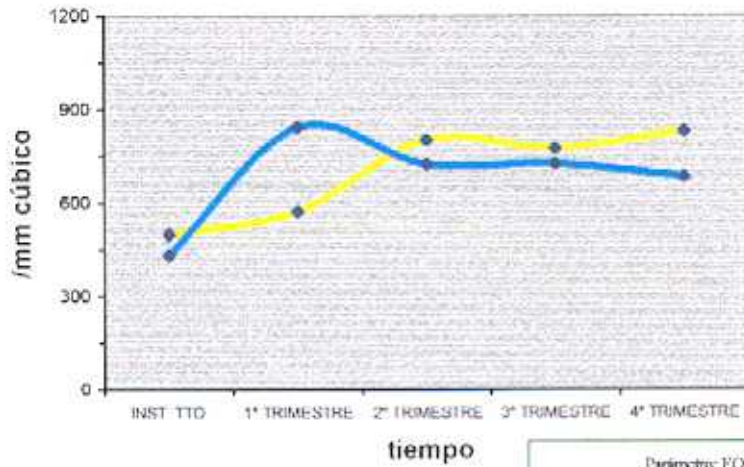
Parámetro: LINFOCITOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	493396x10 ³	1	144.42	0.0000
Fase	9401x10 ³	1	2.75	0.1102
1 Residual	3416x10 ³	24		
Tiempo	1945x10 ³	4	3.06	0.0203
Interacción	270.2x10 ³	4	0.42	0.7904
2 Residual	636.2x10 ³	96		

Fig P.V.C.1.m' - LINFOCITOS)



Parámetro: LINFOCITOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	618573x10 ³	1	174.03	0.0000
Responde	6090.3x10 ³	1	1.71	0.2029
1 Residual	3554.3x10 ³	24		
Tiempo	1762.8x10 ³	4	2.82	0.0292
Interacción	536.7x10 ³	4	0.86	0.4918
2 Residual	625.1x10 ³	96		

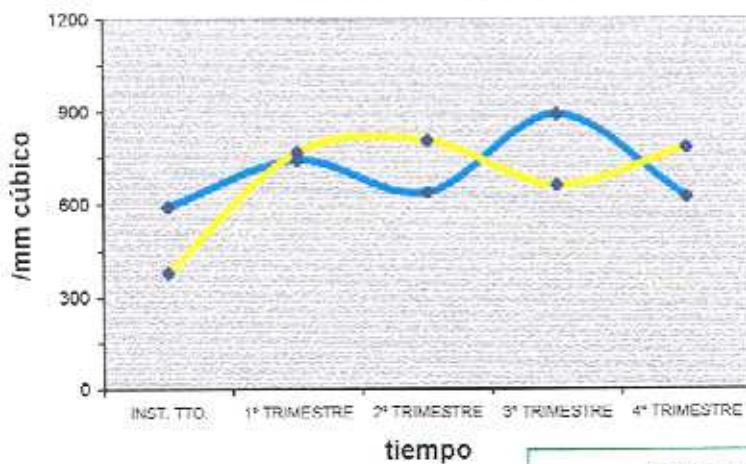
Fig P.V.C.1.n - EOSINOFILOS



● INICIAL (n=8)
● ESTADO (n=18)

Parámetro: EOSINOFILOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	52691×10^3	1	113.18	0.0000
Fase	5.95×10^3	1	0.01	0.9109
1 Residual	465.5×10^3	24		
Tiempo	357.8×10^3	4	2.09	0.0880
Interacción	148.3×10^3	4	0.87	0.4872
2 Residual	171.2×10^3	96		

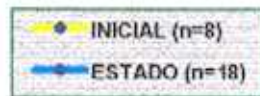
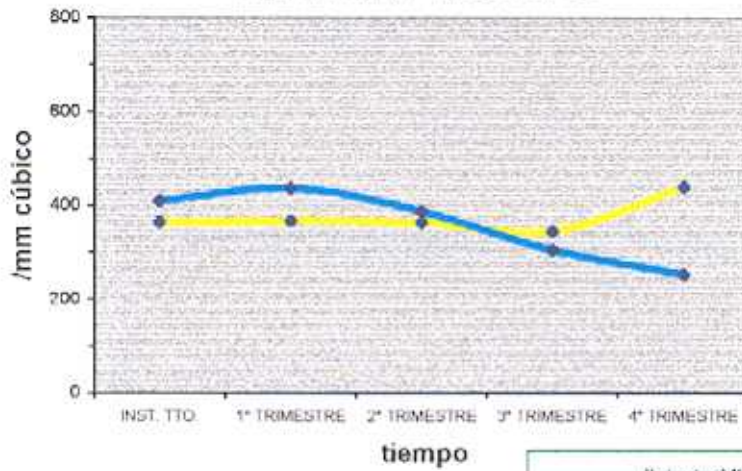
Fig P.V.C.1.n' - EOSINOFILOS



● FAV (n=9)
● MUY FAV (n=17)

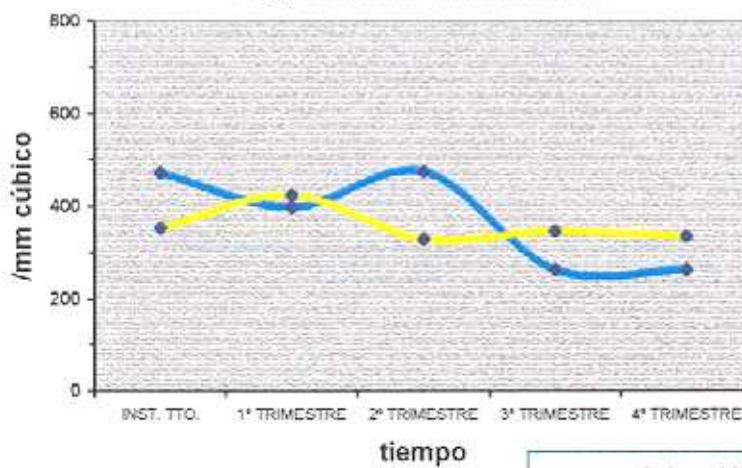
Parámetro: EOSINOFILOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	59560×10^3	1	120.23	0.0000
Respuesta	8.858×10^3	1	0.07	0.8914
1 Residual	465.4×10^3	24		
Tiempo	321.0×10^3	4	1.93	0.1119
Interacción	221.3×10^3	4	1.23	0.2637
2 Residual	168.0×10^3	96		

Fig P.V.C.1.ñ - MONOCITOS



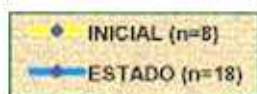
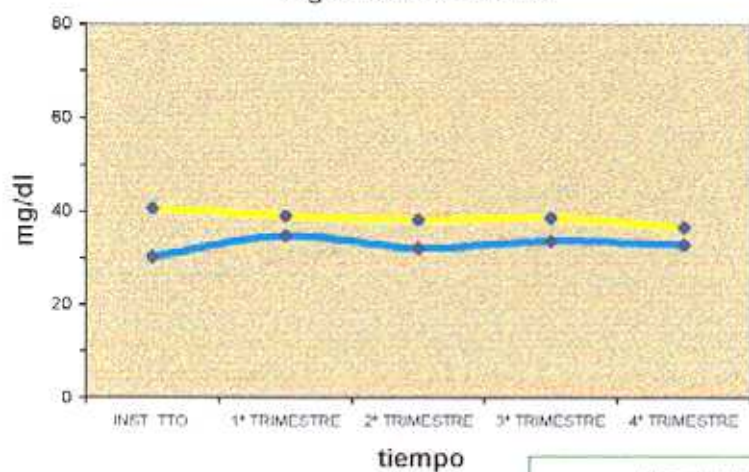
Parámetro: MONOCITOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	14985×10^3	1	128.32	0.0000
Fase	8.6596×10^3	1	0.07	0.7877
1 Residual	116.8×10^3	24		
Tiempo	21.22×10^3	4	0.35	0.8466
Interacción	58.14×10^3	4	0.95	0.4407
2 Residual	61.43×10^3	96		

Fig P.V.C.1.ñ' - MONOCITOS



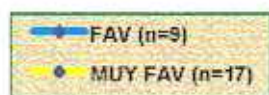
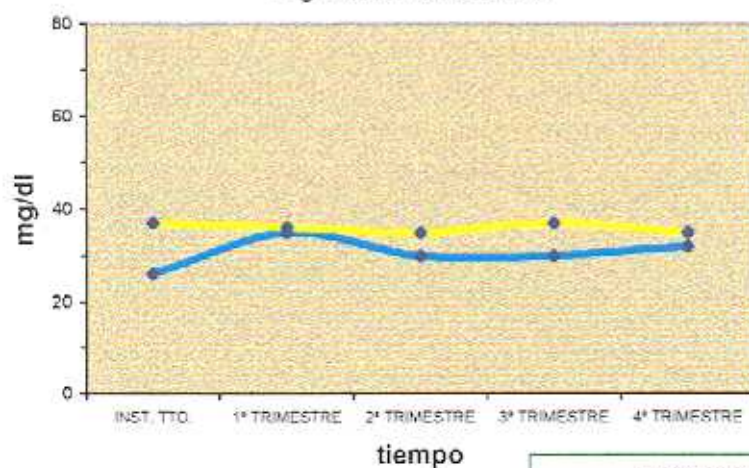
Parámetro: MONOCITOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	15842×10^3	1	133.61	0.0000
Respuesta	7.657×10^3	1	0.07	0.8001
1 Residual	116.8×10^3	24		
Tiempo	81.27×10^3	4	1.33	0.2632
Interacción	69.55×10^3	4	0.14	0.3420
2 Residual	60.96×10^3	96		

Fig P.V.C.1.o - UREA



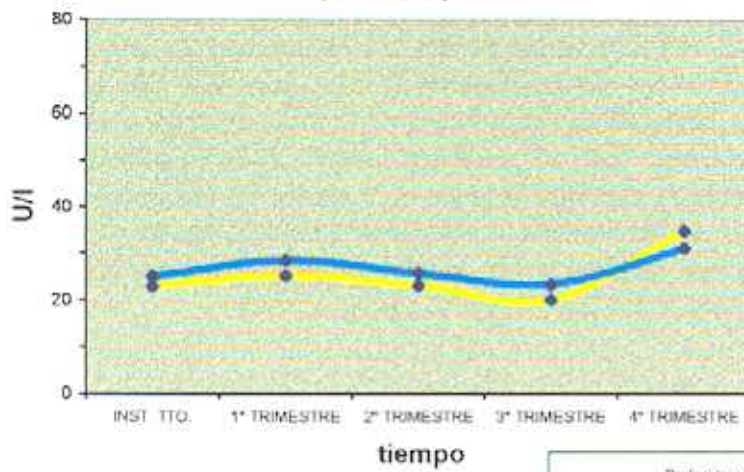
Parámetro: UREA				
FACTOR	VARIANZA	GL	F	SIGNIF.
Media	140912.9	1	467.45	0.0000
Fase	943.2	1	3.13	0.0896
1 Residual	301.4	24		
Tiempo	15.37	4	0.19	0.9434
Interacción	33.94	4	0.47	0.7568
2 Residual	82.65	96		

Fig P.V.C.1.o' - UREA



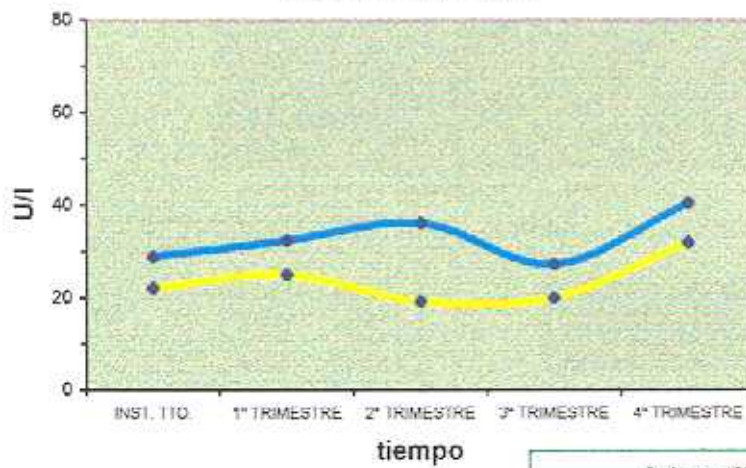
Parámetro: UREA				
FACTOR	VARIANZA	GL	F	SIGNIF.
Media	133331.1	1	441.31	0.0000
Respuesta	976.5	1	3.23	0.0838
1 Residual	300.1	24		
Tiempo	49.66	4	0.62	0.6528
Interacción	85.12	4	1.05	0.3834
2 Residual	80.73	96		

Fig P.V.C.1.p - ALT



Parámetro: ALT				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	80246.4	1	58.96	0.0000
Fase	0.790	1	0.00	0.9810
1 Residual	1360.9	24		
Tiempo	798.2	4	5.52	0.0005
Interacción	239.9	4	1.66	0.1659
2 Residual	144.6	96		

Fig P.V.C.1.p' - ALT



Parámetro: ALT				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	94372.7	1	73.30	0.0000
Respuesta	2556.5	1	2.04	0.1663
1 Residual	1254.4	24		
Tiempo	544.6	4	3.63	0.0085
Interacción	104.4	4	0.69	0.5974
2 Residual	150.2	96		

Para estudiar la evolución de los parámetros biopatológicos durante el periodo de remisión, en función de si los perros llegaron o no a presentar más tarde recidiva, el tiempo de seguimiento escogido fue algo inferior (9 meses repartidos en tres trimestres) al considerado anteriormente. Esto nos permitió contar con casos adicionales, la mayoría de los cuales presentaron la recidiva después de 9 meses de instaurada la terapia pero antes de superar el año de seguimiento. La población total integrada en este estudio fue de 30 casos que quedaron distribuidos en los dos grupos siguientes: REC SI ($n = 7$) y REC NO ($n = 23$) (figuras P.V.C.1.a''- P.V.C.1.p'').

Fig P.V.C.1.a'' - TITULO DE ANTICUERPOS

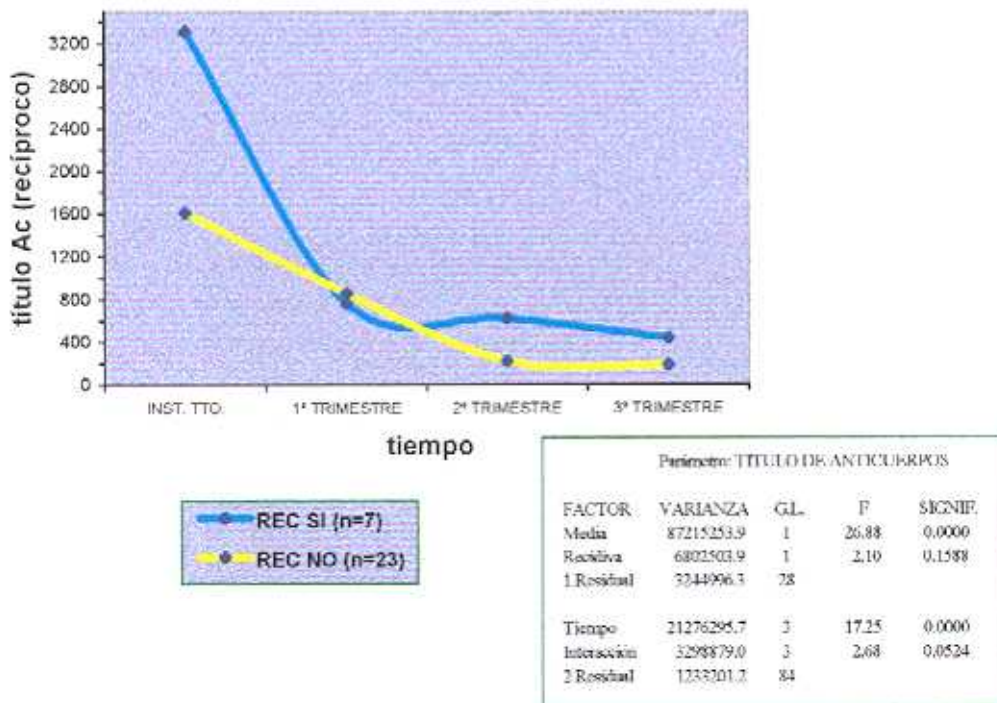
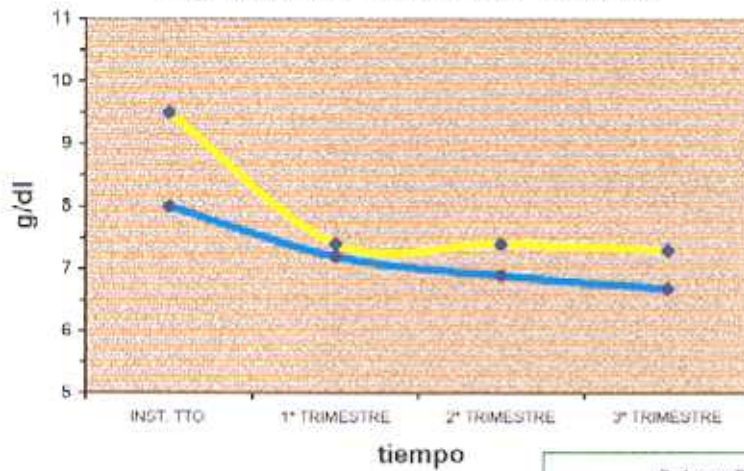
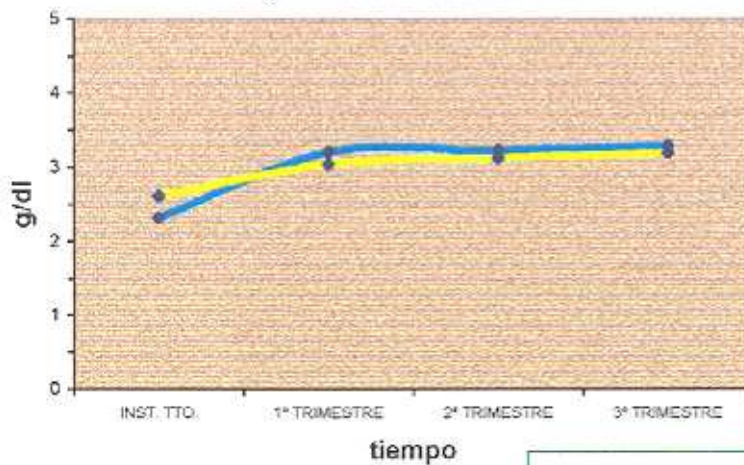


Fig P.V.C.1.b" - PROTEINAS TOTALES



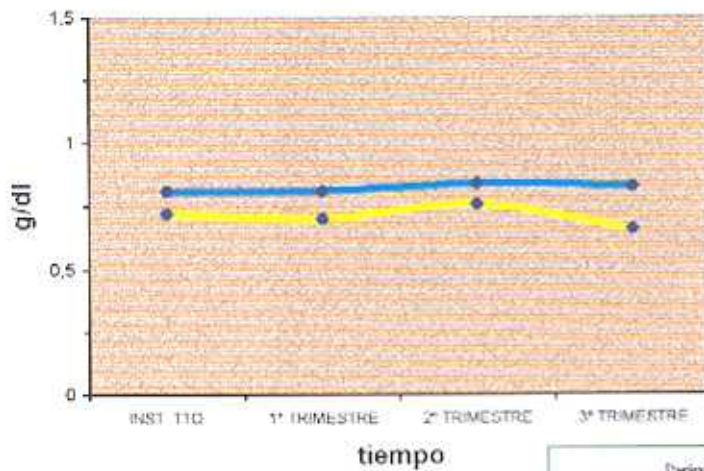
Parámetro: PROTEINAS TOTALES				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	4945.2	1	1895.10	0.0000
Recidiva	10.12	1	3.87	0.0590
1 Residual	2.612	28		
Tiempo	13.71	3	20.02	0.0000
Interacción	1.628	3	2.38	0.0756
2 Residual	0.685	84		

Fig P.V.C.1.c" - ALBUMINA



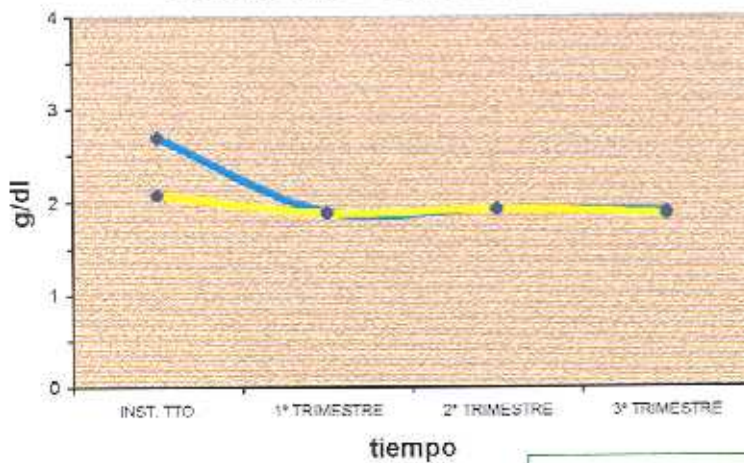
Parámetro: ALBUMINA				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	778.2	1	1314.04	0.0000
Recidiva	0.003	1	0.01	0.9403
1 Residual	0.592	28		
Tiempo	2.770	3	21.25	0.0000
Interacción	0.235	3	1.80	0.1526
2 Residual	0.130	84		

Fig P.V.C.1.d" - ALFA-GLOBULINAS



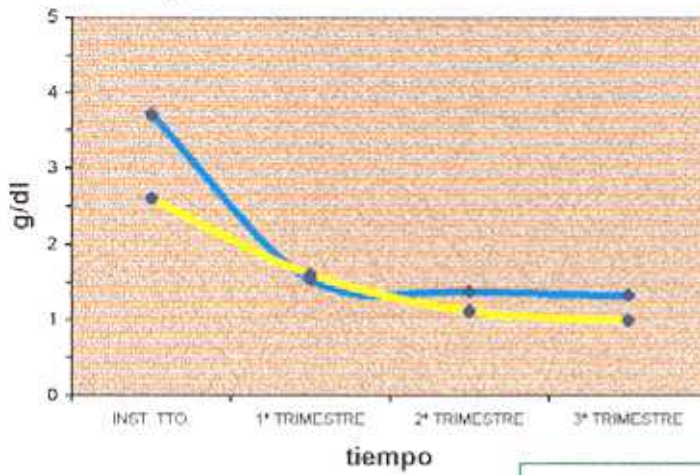
Parámetro: ALFA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL	F	SIGNIF
Media	50.85	1	571.77	0.0000
Residua	0.264	1	2.97	0.0957
1 Residual	0.009	28		
Tiempo	0.011	3	0.38	0.7713
Interaccion	0.008	3	0.30	0.8278
2 Residual	0.028	84		

Fig P.V.C.1.e" - BETA-GLOBULINAS



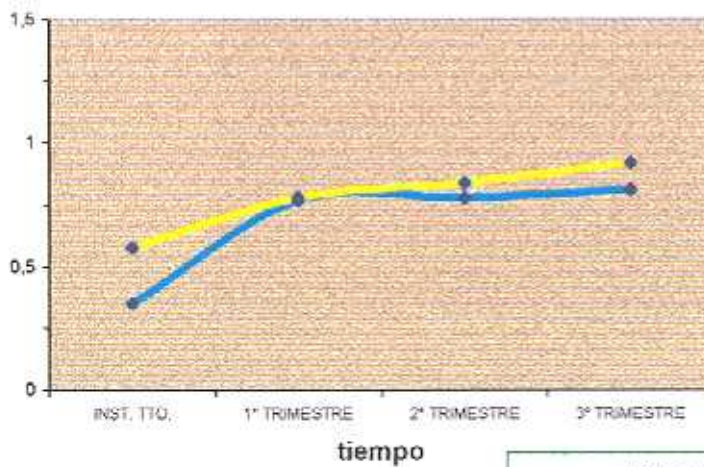
Parámetro: BETA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL	F	SIGNIF
Media	352.43	1	600.83	0.0000
Residua	0.591	1	1.01	0.3239
1 Residual	0.587	28		
Tiempo	1.330	3	7.20	0.0002
Interaccion	0.487	3	2.64	0.0549
2 Residual	0.185	84		

Fig P.V.C.1.f" - GAMMA-GLOBULINAS



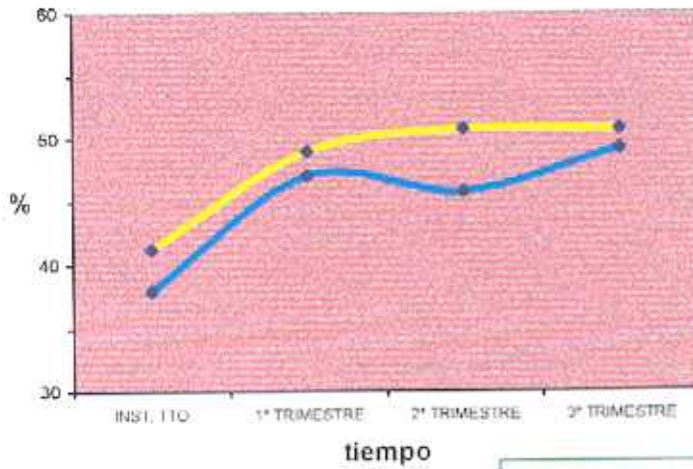
Parámetro: GAMMA-GLOBULINAS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	274.95	1	101.91	0.0000
Residual	3.553	1	1.35	0.2608
1 Residual	2.698	28		
Tiempo	18.50	3	22.67	0.0000
Interacción	1.343	3	1.65	0.1852
2 Residual	0.816	84		

Fig P.V.C.1.g" - ALB/GLO



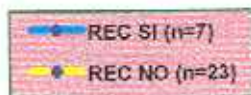
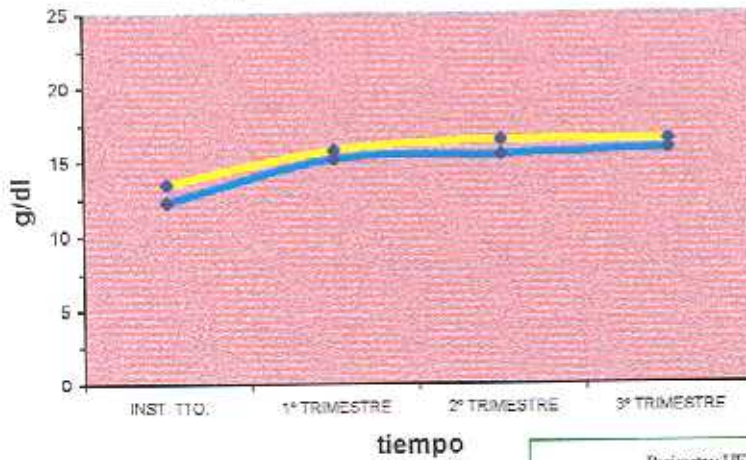
Parámetro: COCIENTE ALB/GLO				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	46.25	1	343.17	0.0000
Residual	0.230	1	1.71	0.2016
1 Residual	0.135	28		
Tiempo	0.676	3	27.70	0.0000
Interacción	0.045	3	1.84	0.1468
2 Residual	0.024	84		

Fig P.V.C.1.h" - HEMATOCRITO



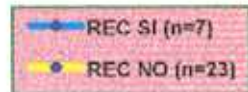
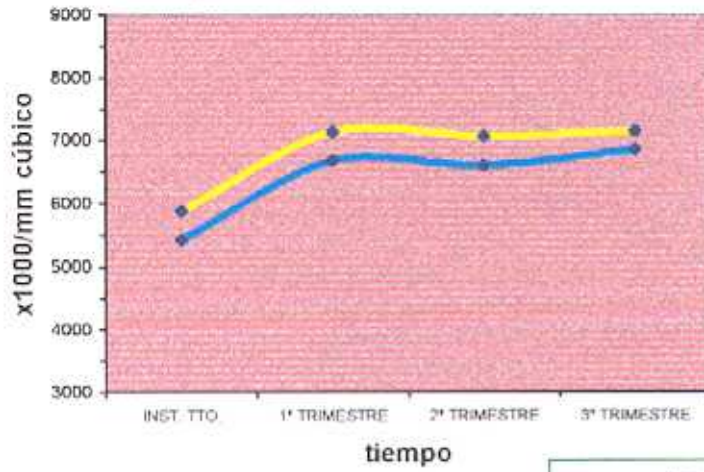
Parametro: HEMATOCRITO				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	186069.0	1	2130.10	0.0000
Residua	186.95	1	2.14	0.1546
1 Residual	87.35	28		
Tiempo	465.4	3	20.26	0.0000
Interacción	12.71	3	0.55	0.6472
2 Residual	22.97	84		

Fig P.V.C.1.i" - HEMOGLOBINA



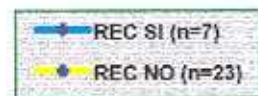
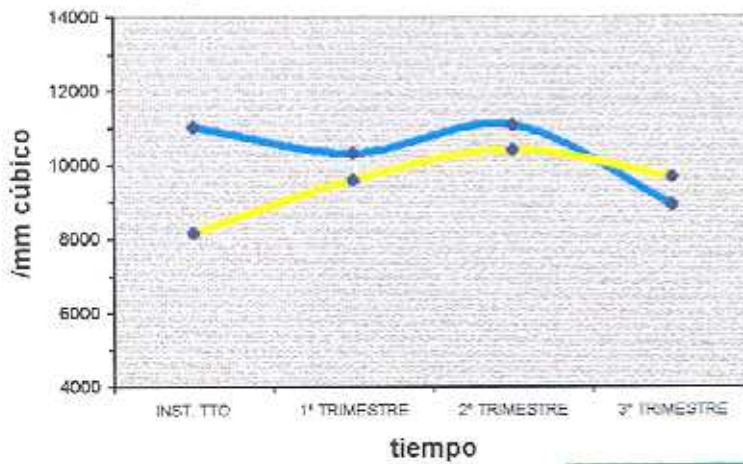
Parametro: HEMOGLOBINA				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	19743.1	1	1604.72	0.0000
Residua	15.97	1	1.30	0.2643
1 Residual	12.50	28		
Tiempo	50.14	3	20.08	0.0000
Interacción	0.506	3	0.20	0.8944
2 Residual	2.498	84		

Fig P.V.C.1.j" - GLOBULOS ROJOS



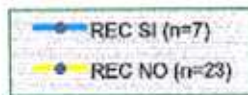
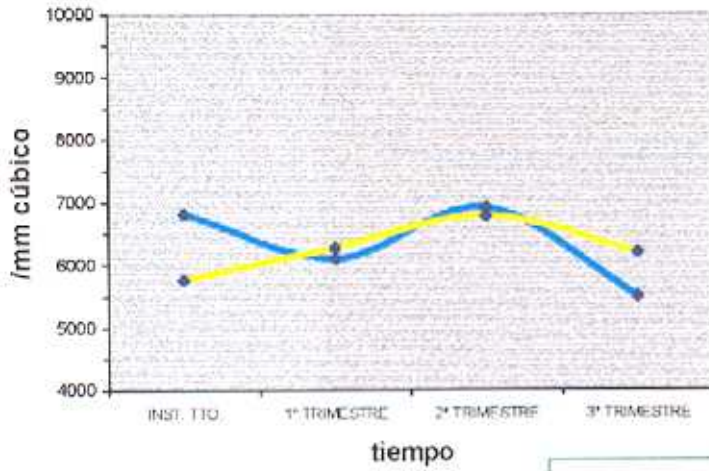
Parámetro: GLOBULOS ROJOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	3726296x10 ³	1	1920.83	0.0000
Residual	3786.4x10 ³	1	1.95	0.1739
1 Residual	1945.1x10 ³	28		
Tiempo	8650.9x10 ³	3	15.28	0.0000
Interacción	33.34x10 ³	3	0.06	0.9811
2 Residual	566.3x10 ³	84		

Fig P.V.C.1.k" - GLOBULOS BLANCOS



Parámetro: GLOBULOS BLANCOS				
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Medio	8113076x10 ³	1	438.58	0.0000
Residual	16646x10 ³	1	0.87	0.3596
1 Residual	19185x10 ³	28		
Tiempo	8495.2x10 ³	3	1.12	0.3442
Interacción	1185.1x10 ³	3	1.57	0.2033
2 Residual	7560.5x10 ³	84		

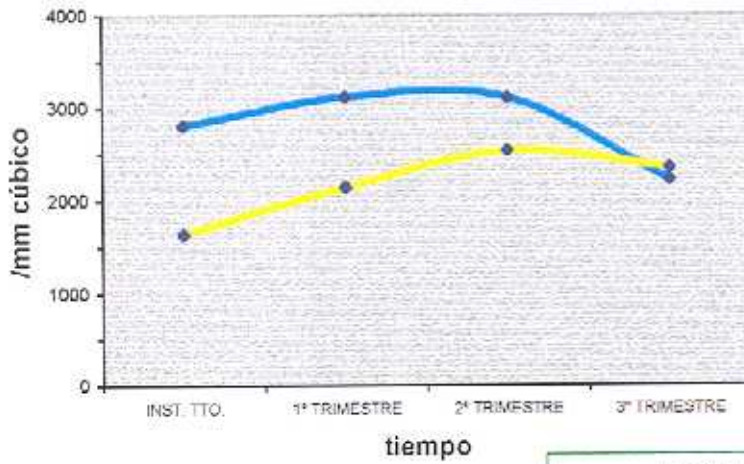
Fig P.V.C.1.l" - NEUTROFILOS



Parámetro: NEUTROFILOS

FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	340627.3×10^3	1	352.80	0.0000
Residua	149.05×10^3	1	0.02	0.9020
1 Residual	9650.79×10^3	28		
Tiempo	3711.2×10^3	3	0.66	0.5771
Interacción	2958.8×10^3	3	0.53	0.6639
2 Residual	5997.5×10^3	84		

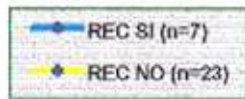
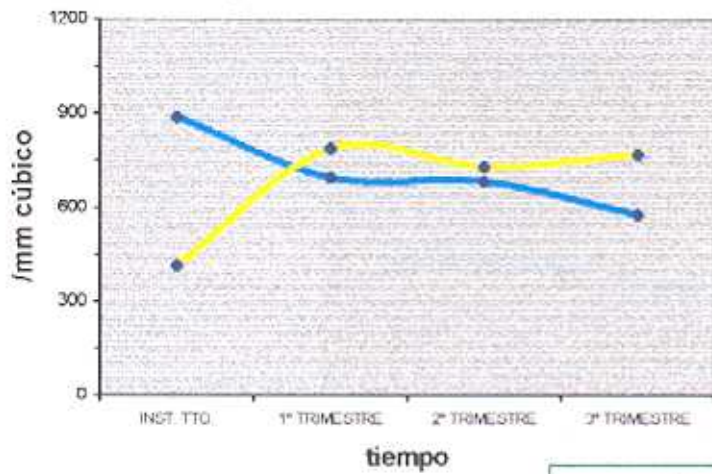
Fig P.V.C.1.m" - LINFOCITOS



Parámetro: LINFOCITOS

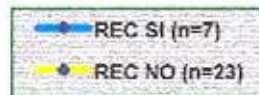
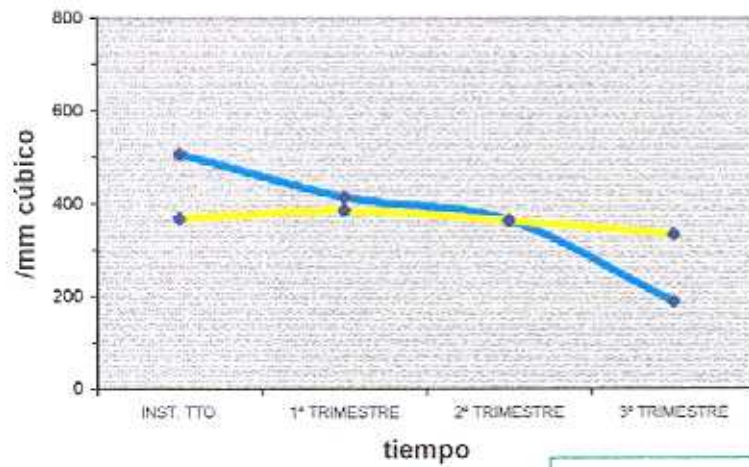
FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	532976×10^3	1	142.34	0.0000
Residua	9045.9×10^3	1	2.42	0.1313
1 Residual	3744.4×10^3	28		
Tiempo	1760.1×10^3	3	2.36	0.0772
Interacción	1786.0×10^3	3	2.39	0.0741
2 Residual	745.95×10^3	84		

Fig P.V.C.1.n" - EOSINOFILOS



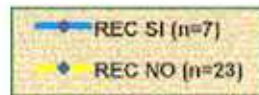
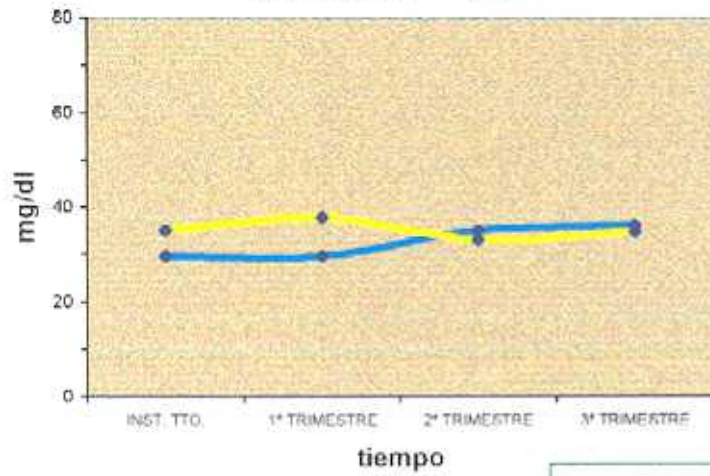
Parámetro: EOSINOFILOS				
FACTOR	VARIANZA	G.L.	F	SIGNIF.
Media	41248x10 ⁷	1	59.48	0.0000
Recidiva	26.14x10 ⁷	1	0.04	0.8475
1 Residual	693.5x10 ⁷	28		
Tiempo	33.85x10 ⁷	3	0.19	0.9040
Interacción	481.4x10 ⁷	3	2.68	0.0521
2 Residual	179.6x10 ⁷	84		

Fig P.V.C.1.n" - MONOCITOS



Parámetro: MONOCITOS				
FACTOR	VARIANZA	G.L.	F	SIGNIF.
Media	11509x10 ⁹	1	81.94	0.0000
Recidiva	0.872x10 ⁹	1	0.01	0.9378
1 Residual	140.4x10 ⁹	28		
Tiempo	123.5x10 ⁹	3	1.94	0.1293
Interacción	75.47x10 ⁹	3	1.15	0.3321
2 Residual	63.64x10 ⁹	84		

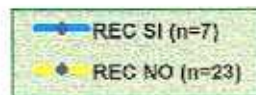
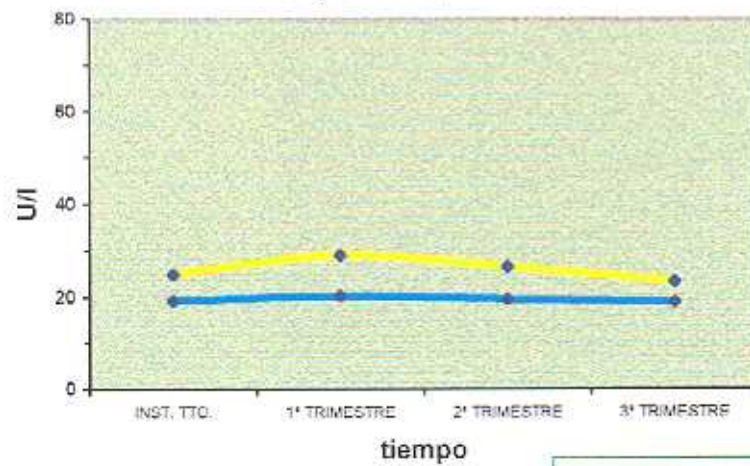
Fig P.V.C.1.o" - UREA



Parametro: UREA

FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	99019.0	1	347.44	0.0000
Recidiva	137.5	1	0.48	0.4930
1 Residual	285.0	28		
Tiempo	34.05	3	0.39	0.7583
Interacción	130.35	3	1.50	0.2493
2 Residual	46.68	84		

Fig P.V.C.1.p" - ALT



Parametro: ALT

FACTOR	VARIANZA	GL.	F	SIGNIF.
Media	44306.3	1	57.78	0.0000
Recidiva	897.7	1	1.17	0.2885
1 Residual	766.3	28		
Tiempo	48.98	3	0.54	0.6393
Interacción	17.48	3	0.19	0.9022
2 Residual	91.49	84		

Al analizar la variación de cada parámetro biopatológico, exclusivamente en función del tiempo (figuras P.V.C.a-P.V.C.p), los resultados estuvieron en concordancia con los obtenidos previamente al comparar los valores medios obtenidos en el momento del diagnóstico y en el de la remisión (tabla P.III.B.9)

Así, los valores del título de anticuerpos, de las proteínas totales, de la albúmina, de las β -globulinas, de las γ -globulinas, del cociente Alb/Glo, de los linfocitos, de la ALT y de los parámetros relacionados con la serie roja presentaron diferencias significativas en función del tiempo ($p < 0.05$) (figuras P.V.C.a-P.V.C.c, P.V.C.e-P.V.C.j, P.V.C.m y P.V.C.p). Tales diferencias se produjeron, para casi la totalidad de estas variables, entre los valores iniciales y los obtenidos en controles posteriores, como puede apreciarse gráficamente por las pendientes de las curvas de evolución de dichas variables. Por el contrario, las variaciones detectadas, a lo largo del tiempo, en los valores de las α -globulinas, de los neutrófilos, de los monocitos y de la urea pueden ser atribuidas al azar ($p > 0.05$) (figuras P.V.C.d, P.V.C.l y P.V.C.n).

Además, este estudio permitió detectar una variabilidad casi significativa ($p = 0.0562$), a lo largo del tiempo, en los valores de los glóbulos blancos (figura p.V.C.k), que se produjo en el segundo trimestre con respecto al valor inicial y que, previamente, no se había manifestado al comparar estos valores iniciales con los del momento de remisión.

En cuanto a los eosinófilos, si bien se observó un incremento de sus valores iniciales tras la instauración del tratamiento (que se mantuvo a lo largo del tiempo) (figura P.V.C.ñ), la variabilidad no llegó a ser significativa ($p = 0.0913$).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en los análisis de varianza al considerar exclusivamente la influencia del tiempo cuando estudiamos la evolución de los parámetros teniendo en cuenta, además de éste, un segundo factor (fase, respuesta a corto plazo o presentación o no de recidiva) (figuras P.V.C.1.a-P.V.C.1.p, P.V.C.1.a'-P.V.C.1.p' y P.V.C.1.a''-P.V.C.1.p'').

Los resultados obtenidos empleando medidas repetidas de los parámetros biopatológicos en función de la fase, de la respuesta a corto plazo y de la presentación o no de recidiva, al considerar la influencia de estos factores independientemente del factor tiempo, estuvieron en concordancia con los observados al caracterizar esas tres variables cualitativas con los valores del momento inicial. Sin embargo, estos resultados no son exactamente iguales ya que en este análisis, además de emplear un menor número de casos, para el cálculo de la variabilidad se consideraron todos los valores obtenidos (para cada caso) a lo largo de todo el periodo de seguimiento.

Por último, dentro del estudio de evolución de los parámetros, queremos destacar la influencia observada (interacción) cuando se consideraron dos factores conjuntamente: el tiempo y cada variable cualitativa (fase, respuesta a corto plazo y presentación o no de recidiva).

La existencia o no de interacción entre los dos factores considerados fue determinada con el fin de poder interpretar correctamente las influencias obtenidas sobre cada parámetro biopatológico, cuando se consideraron estos dos factores por separado, ya que determinadas combinaciones podrían potenciarse o anularse.

En este sentido, tanto la fase de la enfermedad (inicial y estado), como la respuesta a corto plazo (favorable o muy favorable) presentaron interacción con el tiempo cuando estudiamos la evolución del título de anticuerpos, de las proteínas totales, de la albúmina, de las γ -globulinas, del cociente Alb/Glo, del hematocrito, de la hemoglobina y de los glóbulos rojos. Dado que los dos factores habían mostrado, de forma independiente, una influencia significativa sobre estos parámetros biopatológicos debemos admitir que tales diferencias se ven potenciadas por la interacción de cada factor con el tiempo (figuras P.V.C.1.a-c, P.V.C.1.f-j y P.V.C.1.a'-c', P.V.C.1.f'-j').

Por otra parte, la ausencia de diferencias significativas en la evolución de los linfocitos y de los eosinófilos para el grupo de animales que recidivaron frente al que no recidivó, podría ser explicada por la presumible (casi significativa) interacción entre el factor recidiva y el factor tiempo. En estos casos, tal interacción anularía la variabilidad que se produce al considerar los factores de forma independiente. Esta interacción puede ser observada gráficamente por la distinta evolución de las curvas del grupo de animales que llegó a presentar recidiva y del que no, tanto para los linfocitos como para los eosinófilos (figuras P.V.C.1.m'' y P.V.C.1.n''). Efectivamente, el grupo que no presentó recidiva mostró unos valores inferiores de linfocitos y eosinófilos en el momento del diagnóstico, valores que aumentaron visiblemente en el primer trimestre de seguimiento. Sin embargo, el grupo de animales que recidivó partía con unos recuentos medios de linfocitos y eosinófilos más altos y que se mantuvieron o descendieron ligeramente con el paso del tiempo.

Estas posibles interacciones nos indujeron a comparar los valores medios de los recuentos de linfocitos y eosinófilos obtenidos en el momento del diagnóstico y de la remisión en estos dos grupos (recidiva sí y recidiva no). Para este análisis se consideraron todos los casos del estudio prospectivo que alcanzaron la remisión ($n = 48$) (tablas P.V.C.1.1 y P.V.C.1.2).

LINFOCITOS (mm^3) GRUPO / MOMENTO de CONTROL	RECIDIVA NO	RECIDIVA SI	
DIAGNOSTICO	$m = 1684.19$ $\sigma = 796.8$ $n = 31$	$m = 3225.24$ $\sigma = 2173.5$ $n = 17$	$d = 1541.05$ $t = 3.564$ $g.l.: 46$ $p = 0.0009$
REMISION	$m = 2355.61$ $\sigma = 1401.86$ $n = 31$	$m = 3275.06$ $\sigma = 1645.23$ $n = 17$	$d = 919.45$ $t = 2.043$ $g.l.: 46$ $p = 0.047$
	$d = 671.42$ $t = 2.318$ $g.l.: 60$ $p = 0.024$	$d = 49.82$ $t = 0.075$ $g.l.: 32$ $p = 0.9404$	COMPARACION DE MEDIAS

Tabla P.V.C.1.1 – Comparación de las medias de los recuentos de linfocitos obtenidos en el momento del diagnóstico y de la remisión, en función de la respuesta a largo plazo (recidiva sí o no).

EOSINOFILOS (/mm ³) GRUPO / MOMENTO de CONTROL	RECIDIVA NO	RECIDIVA SI	
DIAGNOSTICO	m = 432.10 σ = 440.52 n = 31	m = 823.29 σ = 899.56 n = 17	d = 391.19 t = 2.029 g.l.: 46 p = 0.0482
REMISION	m = 805.64 σ = 596.38 n = 31	m = 651.65 σ = 768.13 n = 17	d = 153.99 t = 0.772 g.l.: 46 p = 0.4442
	d = 373.54 t = 2.805 g.l.: 60 p = 0.0068	d = 171.64 t = 0.561 g.l.: 32 p = 0.5784	COMPARACION DE MEDIAS

Tabla P.V.C.1.2 – Comparación de las medias de los recuentos de eosinófilos obtenidos en el momento del diagnóstico y de la remisión, en función de la respuesta a largo plazo (recidiva sí o no).

P.VI – VALORACION PREDICTIVA DE LA RESPUESTA TERAPEUTICA

Tras conocer las posibles asociaciones entre las variables consideradas (título de anticuerpos, proteinograma, hemograma, etc.) y las cuestiones planteadas sobre el porvenir de los casos clínicos tras la instauración de tratamiento específico (desarrollo de efectos colaterales, consecución de la remisión, aparición de recidivas), quisimos valorar la probabilidad de presentación de dichos sucesos en función de esas mismas variables considerándolas, en este caso, conjuntamente. Para ello, utilizando el programa BMDPPR, realizamos los correspondientes análisis de regresión logística capaces de seleccionar y cuantificar el efecto de aquellas variables que se muestran como factores de riesgo en el hecho de que se produzca o no el suceso planteado.

La probabilidad relativa u odds ratio (O.R.) para cada suceso (de que ocurra (Psi) sobre que no ocurra (Pno)), en función de los valores de las variables independientes seleccionadas, viene dada por la ecuación:

$$O.R. = \text{Psi} / \text{Pno} = e^{a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n}$$

de donde

$$\text{Psi} = O.R. / 1 + O.R.$$

P.VIA –. PROBABILIDAD DE REMISION SI/REMISION NO

En cuanto a las variables que, en el momento del diagnóstico (o de la instauración de la terapia) se vieron implicadas en la probabilidad de alcanzar o no la remisión, la aplicación del análisis multivariante seleccionó, de entre todas ellas y en primer lugar, la fase de la enfermedad como el factor más predictivo. Esta asociación ya se observó (mediante el análisis univariante) cuando realizamos la caracterización de la remisión (tabla P.III.1). Asimismo, el estado de las funciones hepática y renal, íntimamente relacionadas con la fase de la enfermedad, se asociaron significativamente con el tipo de evolución a corto y/o medio plazo.

Descartando estas tres variables (debido a su obvia relación) así como la creatinina (al no haber sido valorada en todos los casos), estudiamos el valor de la probabilidad relativa de que se alcanzara o no la remisión considerando el resto de los parámetros en el momento del diagnóstico. En este caso, la única variable cualitativa incluida fue la sintomatología. Cuando requerimos un nivel de significación mayor del 95% el test seleccionó la urea y la ALT.

Admitiendo una significación a partir de un 90% fueron seleccionadas hasta cuatro de estas variables como factores predictivos, en el orden siguiente: urea, ALT, neutrófilos y título de anticuerpos. Todas ellas aportaban información complementaria sobre la probabilidad de alcanzar la remisión frente a la de no alcanzarla, probabilidad que puede ser cuantificada aplicando la fórmula anteriormente expuesta. Las tablas y fórmulas que a continuación se exponen muestran los resultados de este análisis:

VARIABLE	COEF.	Sc	COEF. EXP.	I.C. 95% COEF. EXP	p
UREA (mg/dl)	- 0.05506	0.0179	0.946	0.913 – 0.981	0.000
ALT (U/l)	-0.02522	0.0109	0.975	0.945 – 0.997	0.023
CONSTANTE	5.123	1.15	168	16.9 – 1670	-

$$O.R. = \frac{PREM SI}{PREM NO} = e^{5.123 - 0.05506 \times urea - 0.02522 \times ALT}$$

Fórmula 1

VARIABLE	COEF.	Se	COEF. EXP.	LC. 95% COEF. EXP	p
UREA (mg/dl)	- 0.08534	0.0299	0.918	0.865 – 0.975	0.000
ALT (U/l)	- 0.03019	0.0132	0.970	0.945 – 0.996	0.023
NEUTROFILOS (/mm ³)	- 0.00038	0.00020	0.999962	0.99922 – 1.0	0.093
TITULO Ac (RECIPROCO)	- 0.00049	0.00028	0.999508	0.998952 – 1.0	0.053
CONSTANTE	10.72	3.54	0.45E+05	37.8 – 0.54E+08	-

$$O.R. = \frac{PREM\ SI}{PREM\ NO} = e^{10.72 - 0.08534 \times urea - 0.03019 \times ALT - 0.00038 \times neutrófilos - 0.00049 \times título\ Ac}$$

Fórmula 2

Los cuatro parámetros seleccionados mostraron una asociación inversa con la probabilidad de que se alcanzara la remisión. La influencia sobre el OR por unidad (aumento o disminución) de cada variable queda cuantificada por el valor del coeficiente exponencial. Es decir, dicho(s) coeficiente(s) multiplica(n) o divide(n) el valor del O.R cuando aumenta(n) o disminuye(n), respectivamente, la(s) variable(s) correspondiente(s).

P.VI.B –. PROBABILIDAD DE RESPUESTA A CORTO PLAZO FAVORABLE/MUY FAVORABLE

Los animales en fase de estado que llegaron a remitir ($n = 33$) presentaron, como ya se ha descrito, una respuesta terapéutica a corto plazo favorable ($n = 14$) o muy favorable ($n = 19$). Aunque estas dos modalidades de respuesta fueron previamente caracterizadas, quisimos saber si alguna de las variables que, en el momento del diagnóstico mostraron asociación con estos tipos de respuesta a corto plazo, actuaban como un factor predictivo que permitiera cuantificar la probabilidad relativa de presentación de uno u otro tipo de respuesta en este grupo de animales.

El modelo de regresión logística seleccionó, exclusivamente, el recuento eritrocitario como única variable que aportaba información significativa ($p = 0.009$) para predecir el tipo de respuesta a corto plazo en los perros que, hallándose en fase de estado en el momento del diagnóstico, llegaron a remitir. La probabilidad relativa (odds ratio) queda valorada en la siguiente tabla y ecuación:

VARIABLE	COEF.	Sc	COEF. EXP.	I.C. 95% COEF. EXP	P
GLOBULOS ROJOS (x1000/mm ³)	- 0.0008492	0.000381	0.999	0.998 - 1.0	0.009
CONSTANTE	4.401	2.13	81.5	1.05 - 0.63E+04	-

$$O.R. = P_{FAV} / P_{MUYFAV} = e^{4.401 - 0.00085 \times \text{glóbulos rojos (en miles)}}$$

Fórmula 3

P.VLC -. PROBABILIDAD DE EFECTOS COLATERALES NO/ EFECTOS COLATERALES SI

De entre las posibles variables consideradas en el momento del diagnóstico que pudieran verse implicadas en la probabilidad de que se desarrollasen o no efectos colaterales en el transcurso del tratamiento, el análisis multivariante seleccionó en primer y único lugar la concentración de α -globulinas ($p=0.028$), con el coeficiente exponencial (por unidad de variación) y el odds ratio siguientes:

VARIABLE	COEF.	Sc	COEF. EXP.	I.C. 95% COEF. EXP	P
α -GLOBULINAS (g/dl)	- 2.653	1.25	0.0705	0.00577 - 0.861	0.028
CONSTANTE	3.413	1.16	30.3	0.0058 - 0.861	-

$$O.R. = P_{E.COLAT\ NO} / P_{E.COLAT\ SI} = e^{3.413 - 2.653 \times \alpha\text{-globulinas}}$$

Fórmula 4

La concentración de α -globulinas, en el momento del diagnóstico (o de instauración de la terapia) muestra una asociación directa con la probabilidad de presentar efectos colaterales (o inversa con la de no desarrollarlos). El coeficiente exponencial de esta asociación por cada 0.1 g/dl de α -globulinas fue calculado en 0.77. Es decir, la probabilidad relativa (O.R.) de que no aparezcan efectos colaterales frente a que sí aparezcan durante el tratamiento aumentaría dividiéndolo por 0.77 veces por cada 0.1 g/dl que disminuyera la fracción α de las globulinas.

P.VI.D –. PROBABILIDAD DE UN CICLO/MAS DE UN CICLO DE TRATAMIENTO HASTA LA REMISION

Para estudiar la probabilidad relativa con respecto a esta variable fue necesario transformar el número de ciclos administrados hasta la remisión en una variable cualitativa con dos categorías: 1) un solo ciclo de tratamiento y 2) más de un ciclo de tratamiento. Nuestro propósito era averiguar si existía alguna variable, en el momento del diagnóstico, que pudiera actuar como factor predictivo en la probabilidad relativa de que los perros que remiten reciban un solo ciclo frente a que reciban más de un ciclo de tratamiento.

El modelo de regresión logística seleccionó en primer lugar el cociente Alb/Glo ($p < 0.0001$) en el momento de la instauración de la terapia. Esta asociación nos pareció lógica puesto que dicha variable fue considerada (en la propia metodología del ensayo terapéutico) como criterio para decidir la cesación de la terapia.

En el siguiente paso, el análisis estadístico seleccionó la hemoglobina como segunda variable que aportaba información complementaria a la anterior, si bien su valor predictivo sólo llegó a ser casi significativo ($p = 0.08$). El coeficiente exponencial (por unidad de variación) y el odds ratio, considerando únicamente el cociente Alb/Glo o incluyendo ambos parámetros, se muestran en las siguientes tablas y ecuaciones:

VARIABLE	COEF.	Sc	COEF. EXP.	I.C. 95% COEF. EXP	p
ALB/GLO	6.926	2.39	0.102E+04	8.36 - 124E+03	0.000
CONSTANTE	-1.974	0.911	0.139	2.22 - 0.870	-

$$O.R. = P_{1 \text{ ciclo}} / P_{>1 \text{ ciclo}} = e^{-1.974 + 6.926 \times \text{Alb/Glo}}$$

Fórmula 5

VARIABLE	COEF.	Sc	COEF. EXP.	I.C. 95% COEF. EXP	p
ALB/GLO	4.977	2.62	145	0.737 - 28600	0.000
HEMOGLOBINA (g/dl)	0.2972	0.183	1.35	0.932 - 1.94	0.084
CONSTANTE	-4.967	2.13	0.696E-02	0.96E-04 - 0.506	-

$$O.R. = P_{1 \text{ ciclo}} / P_{>1 \text{ ciclo}} = e^{-4.967 + 4.977 \times \text{Alb/Glo} + 0.2972 \times \text{Hb}}$$

Fórmula 6

Para la primera ecuación, el coeficiente exponencial del O.R. fue de 1.99 por cada variación de 0.1 del cociente Alb/Glo. En la segunda ecuación, los coeficientes exponenciales fueron: 1.64 por cada variación de 0.1 del cociente Alb/Glo y 1.35 por cada g/dl de hemoglobina.

P.VI.E –. PROBABILIDAD DE RECIDIVA SI/RECIDIVA NO

A la hora de calcular la probabilidad de aparición de recidiva frente a que ésta no se presentara, en aquellos animales que alcanzaron la remisión, se consideraron los valores de los distintos parámetros tanto en el momento del diagnóstico como en el de remisión.

Cuando consideramos sólo el momento del diagnóstico, la única variable seleccionada de forma estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en la predicción de la presentación de recidiva fue el recuento linfocitario:

VARIABLE (momento diagnóstico)	COEF.	Sc	COEF. EXP.	I.C. 95% COEF. EXP	p
LINFOCITOS (/mm ³)	0.0008584	0.332E-03	1.00086	1.00019–1.00015	0.001
CONSTANTE	- 2.503	0.783	0.818E-01	0.0169 – 0.396	-

$$O.R. = P_{REC SI} / P_{REC NO} = e^{-2.503 + 0.00086 \times \text{linfocitos (diagnóstico)}}$$

Fórmula 7

Al considerar el momento de la remisión, igualmente el número de linfocitos se reveló como el parámetro más significativo. En este caso, el test distinguió en segundo lugar las α -globulinas ($p < 0.05$) como parámetro suministrador de información adicional para predecir la recidiva. La probabilidad relativa de la presentación del suceso estudiado (recidiva) se muestra a continuación:

VARIABLE (momento remisión)	COEF.	Sc	COEF. EXP.	I.C. 95% COEF. EXP	p
LINFOCITOS (/mm ³)	0.0005887	0.255E-03	1.00059	1.0001 – 1.0011	0.030
α -GLOBULINAS (g/dl)	3.019	1.61	20.5	0.800 – 524	0.048
CONSTANTE	- 4.642	1.70	0.963E-02	0.315E-03 - 0.29	-

$$O.R. = P_{REC SI} / P_{REC NO} = e^{-4.642 + 0.00059 \times \text{linfocitos (remisión)} + 3.019 \times \alpha\text{-glo (remisión)}}$$

Fórmula 8

Finalmente, considerando ambos momentos (diagnóstico y remisión) conjuntamente, el análisis de regresión logística seleccionó dos variables, el recuento de linfocitos en el momento del diagnóstico y el valor de la hemoglobina en el de remisión, como factores complementarios para calcular la probabilidad de recidiva:

VARIABLE (momento diagnóstico + remisión)	COEF.	Sc	COEF. EXP.	LC. 95% COEF. EXP.	p
LINFOCITOS (/mm ³)	0.001045	0.000394	1.00105	1.00026 - 1.0018	0.001
HEMOGLOBINA (g/dl)	- 0.5004	0.266	0.606	0.355 - 1.04	0.039
CONSTANTE	4.942	3.86	140	0.0586-334E+03	-

$$O.R. = \frac{PREC SI}{PREC NO} = e^{4.942 + 0.00104 \times \text{linfocitos (diagnóstico)} - 0.5004 \times \text{Hb (remisión)}}$$

Fórmula 9

Este estudio pone de manifiesto una asociación muy clara entre la probabilidad de que se produzca la recidiva y el valor del recuento linfocitario que presente el paciente, tanto en el momento del diagnóstico como en la remisión. Sin embargo, al considerar los dos momentos el modelo estadístico descarta el número de linfocitos en el momento de la remisión, ya que no aportaría información adicional (una vez conocido e incluido en el test el valor inicial de este parámetro) para predecir la probabilidad relativa de aparición de la recidiva. Esto parece evidente ya que quedó demostrado la existencia de una estrecha correlación ($p=0.0001$) entre los valores linfocitarios de estos dos momentos (tabla P.III.B.9).

DISCUSSION

I - DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DE LAS MUESTRAS

I.A -. DESCRIPCION

Las muestras seleccionadas tanto para el estudio retrospectivo como para el prospectivo están compuestas por perros con leishmaniosis natural sometidos a terapia específica por lo que, en principio y siendo estrictos, los casos incluidos en nuestro trabajo sólo podrían ser representativos de la subpoblación leishmaniósica (dentro de la población leishmaniósica general) susceptible de ser tratada.

Diversos criterios (sanitarios, clínicos, económicos, etc.) influyen en la decisión de iniciar o no un tratamiento (Gradoni *et al*, 1988; Mancianti *et al*, 1988; Alvar *et al*, 1995; Tesouro *et al*, 1995c) y, por tanto, en el hecho de que los animales afectados sean integrados o no dentro de esta subpoblación. Los criterios clínicos serían particularmente determinantes a la hora de adoptar una u otra resolución (Tesouro *et al*, 1995c). En este sentido, un hecho ampliamente demostrado es la pobre respuesta terapéutica que presentan los animales con fallo hepático y, sobre todo, renal (y por extensión en fases avanzadas de la enfermedad) (Slappendel, 1988; Naskidachvilli, 1988). Por tanto, generalmente se descarta la posibilidad de tratamiento ante estas situaciones (Catarsini, 1989; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992; Franc, 1993; Tesouro *et al*, 1995c). Aun así, en nuestras muestras se incluye una reducida proporción de casos que presentan tales alteraciones.

La enorme variabilidad y complejidad de este proceso, patente a nivel individual, dificulta, a pesar de la elevada casuística, la interpretación de estudios epidemiológicos. Esta dificultad es aún más manifiesta cuando se pretende extrapolar los resultados de ensayos clínicos o experimentales a la población general.

Al revisar la bibliografía encontramos muy pocas publicaciones en las que se indique o sugiera la representatividad de las muestras en las que se valoran distintos protocolos de tratamiento (Slappendel, 1988; Mancianti, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992; Denerolle, 1996; Lamothe, 1997). Además, no siempre se describen completamente las características de estas muestras y cuando encontramos descripciones detalladas éstas suelen realizarse sobre grupos muy reducidos o incluso en casos aislados (Varela, 1992; Liste *et Gascón*, 1995; Lester *et Kenyon*, 1996). Así, resulta sumamente difícil saber hasta qué punto las muestras objeto de estudio son representativas de la población general.

Por todo lo anteriormente expuesto y como punto de partida, consideramos fundamental realizar una descripción y caracterización detalladas de las muestras seleccionadas para nuestros estudios con el fin de analizar e interpretar correctamente los resultados y poder hacer ciertas extrapolaciones a la población general que representen. Para ello compararemos nuestras muestras con las referidas a través de otras publicaciones.

A pesar de los avances en los procedimientos diagnósticos, que permiten la detección precoz de la enfermedad, los resultados de una encuesta realizada entre más de 50 clínicas veterinarias de la Comunidad de Madrid (Tesouro *et al*, 1995c) indican que el mayor porcentaje de los perros diagnosticados de leishmaniosis (68,9%) queda englobado en las fases de estado (síntomatología y/o alteraciones biopatológicas evidentes) de la enfermedad.

Al comparar la población canina diagnosticada de leishmaniosis en dicha encuesta (y dentro de ésta la subpoblación tratada) con las muestras de nuestro estudio, sus distribuciones, en función de la **fase de la enfermedad** y cuadro clínico no difieren de forma significativa, por lo que nuestras muestras podrían ser consideradas como representativas de la población leishmaniósica general, al menos, de nuestra área geográfica (Tesouro *et al*, 1995).

Dentro de nuestro estudio, también comprobamos que las diferencias observadas entre las distribuciones de las muestras de los distintos protocolos terapéuticos, atendiendo a diversos criterios o variables (fase de la enfermedad, edad o sexo), pueden ser siempre atribuidas al azar. Esta reiterada homogeneidad confirmaría la procedencia común de nuestras muestras.

En lo que se refiere a la distribución de los casos en función de éstas y otras variables cualitativas (sexo, raza, edad, fallo renal o hepático), nuestros resultados estarían en concordancia con lo descrito en la bibliografía. Según la literatura no parece existir una predisposición en función de la **raza** del animal y, de hecho, la enfermedad se describe en todo tipo de razas (Slappendel, 1988; Abranches *et al*, 1991a; Ferrer, 1992; Ozon *et al*, 1995; Denerolle, 1996). Aun así, Denerolle (1996) encuentra un mayor porcentaje de boxers y de animales de gran talla entre la población enferma (Denerolle, 1996), mientras que Ozon y col. (1995) indica una menor frecuencia de casos entre los caniches y los york-shire (Ozon *et al*, 1995). Abranches y col. (1991), a pesar de diagnosticar la enfermedad en una gran variedad de razas, observan que la infección es significativamente más frecuente en dobermann y pastor alemán, con respecto a la población canina global (Abranches *et al*, 1991a). Martínez y Lloret (1992) y Crende y col. (1992) también detectan un predominio de pastores alemanes entre la población enferma (19/38 y 8/52, respectivamente) (Martínez *et Lloret*, 1992; Crende *et al*, 1992) aunque particularmente Crende y col. (1992), de forma análoga a nuestras observaciones, detectan un predominio mucho mayor de los mestizos (22/52) (Crende *et al*, 1992).

Ferrer (1992) explica estos distintos porcentajes en la presencia de la enfermedad en las distintas razas por el mayor o menor grado de exposición al vector, según los hábitos de vida (Ferrer, 1992). Respaldando esta aseveración Martínez y Lloret (1992), en un estudio, han constatado la permanencia preponderante de todos los perros afectados en el exterior (Martínez *et Lloret*, 1992).

La enorme variedad de razas incluidas en nuestro estudio prospectivo (figura P.I.A.1.a) determinó que esta variable no fuese tenida en cuenta en el estudio estadístico llevado a cabo dentro del mismo. En cualquier caso, no parece que la raza tenga ninguna influencia en la respuesta al tratamiento (Denerolle, 1996).

Como se recoge en el capítulo de resultados, nuestras muestras se componen de individuos de **ambos sexos** (figura P.I.A.1.b), con un predominio de los machos sobre las hembras en el estudio retrospectivo (64 *versus* 40) (figura R.I.a), coincidiendo con las observaciones de Slappendel (1988) (59 *versus* 36), Martínez y Lloret (1992) (23 *versus* 15) y Denerolle (1996) (84 *versus* 41) (Slappendel, 1988; Martínez *et al.*, 1992; Denerolle, 1996). Aunque también Abranches y col. (1991) observan un predominio de los machos sobre las hembras entre los perros afectados de leishmaniosis (113 *versus* 53) (Abranches *et al.*, 1991a) no encuentran, al igual que Ozon y col. (1995), diferencias significativas cuando comparan tasas de prevalencia entre los dos sexos (Ozon *et al.*, 1995).

Por el contrario, Tesouro (1984) señala una asociación entre el sexo y el padecimiento de la enfermedad, valorando la tasa de incidencia en 1.22 veces mayor en los machos que en las hembras (Tesouro, 1984a). En medicina humana también ha sido descrito, por algunos autores, este predominio tanto en la distribución como en las tasas de morbilidad (Cambroner *et al.*, 1983; Brabin *et al.*, 1992; Federico *et al.*, 1997), quedando así sugerida una mayor susceptibilidad a la enfermedad por parte de los machos que de las hembras.

Al igual que en otros trabajos (Slappendel, 1988; Denerolle, 1996), nuestros estudios recogen la presencia de animales de todos los grupos de **edades** (jóvenes, adultos y viejos, pero la población adulta (entre 2 y 8 años) es, con mucho, la más abundante (figuras R.I.b y P.I.A.1.c). Martínez y Lloret (1992) observan que toda su población de estudio se compone de perros entre 2 y 10 años (con una media de 5 años) (Martínez *et al.*, 1992). También Abranches y col. (1991a) detectan, entre la población enferma, un claro predominio de perros adultos (entre 3 y 9 años) (91/146), predominio que se mantiene cuando se considera su tasa de prevalencia (Abranches *et al.*, 1991a). Lógicamente, el tiempo de exposición a los vectores actuaría como un factor de riesgo de infección, que Ozon y col. (1995) calculan en 3.42 veces mayor para los animales de 2 años o más que para los menores de esa edad (Ozon *et al.*, 1995).

La proporción de casos tratados en **fases avanzadas** de la enfermedad, debido fundamentalmente a la presencia de un fallo renal o hepático (figuras P.I.A.1.f y P.I.A.1.f), con elevación de la ALT, la urea y/o la creatinina (figuras P.I.A.2.p, P.I.A.2.q y P.I.A.2.r), como ya ha sido mencionado, fue relativamente baja. De hecho, este tipo de alteraciones graves suelen describirse como poco frecuentes en la bibliografía (Cabassu, 1988b; Catarsini, 1989; Martínez *et al.*, 1992; Ferrer, 1992; Gascón, 1994; Tesouro *et al.*, 1995; Denerolle, 1996), probablemente debido a que los casos suelen ser detectados en fases menos evolucionadas de la enfermedad, en las que este tipo de lesiones graves todavía no está presente (Tesouro *et al.*, 1992a).

Los **síntomas** observados en nuestro estudio prospectivo coinciden con los reconocidos en esta enfermedad. Aunque la frecuencia de presentación de estos síntomas varían de unos autores a otros, los más habituales son la linfadenopatía, las lesiones cutáneas (especialmente alopecia, descamación y ulceración) (Lanotte *et al.*, 1979; Rodríguez *et al.*, 1984; Slappendel, 1988; Abranches, 1991a; Martínez *et al.*, 1992; Ferrer, 1992; Varela, 1992; Denerolle, 1996), así como la pérdida de peso (Rodríguez *et al.*, 1984; Slappendel, 1988; Martínez *et al.*, 1992; Ferrer, 1992; Varela, 1992) coincidiendo con nuestros datos.

Al igual que Ferrer (1992) (Ferrer, 1992) detectamos cojeras con una cierta frecuencia, en un 19.7% de los casos, aunque no tan elevada como la señalada por Slappendel (1988) (37.5%) (Slappendel, 1988). En lo que se refiere a la presencia de uñas anormales, la bibliografía arroja porcentajes que van desde el 6% de los casos (Ozon *et al*, 1995) hasta el 60.7% (Abranches *et al*, 1991a). Nuestras observaciones (13.1%) estarían más en concordancia con las de Slappendel (1988), que detecta este tipo de alteración en un 20% de los casos (Slappendel, 1988). Ninguno de nuestros casos presentó epistaxis en el momento del diagnóstico, a pesar de que ésta ha sido descrita en un 10-15% de los casos por otros autores (Slappendel, 1988; Denerolle, 1996).

De entre los parámetros biopatológicos incluidos en nuestro estudio prospectivo, la presencia de **títulos de anticuerpos** positivos (figura P.I.A.2.b), más o menos elevados, así como el tipo de alteraciones en los valores iniciales de las distintas fracciones del **proteinograma** (figuras P.I.A.2.c,d,f,g,h), coinciden con las observaciones de la mayor parte de los autores consultados (Vitu *et al*, 1973; Giauffret *et al*, 1976; Guercio *et Iannizzotto*, 1978; Tesouro, 1984a; Rodríguez *et al*, 1984; Groulade, 1988; Slappendel, 1988; Cabassu, 1988b; Cairó *et Font*, 1991; Varela, 1992; Binhazim *et al*, 1993; Denerolle, 1996). Como el grado de perturbación de estos parámetros dependería del momento evolutivo en que se hallara el animal en el momento del diagnóstico (Vitu *et al*, 1973; Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1988; Tesouro *et al*, 1992a; Binhazim *et al*, 1993; Denerolle, 1996) y tan sólo en torno a un 20% de nuestros casos se diagnosticaron en fases iniciales de la enfermedad, era previsible que una proporción importante de ellos mostrara una disproteinemia plasmática marcada, caracterizada por un aumento de las γ -globulinas y, en menor grado, de las β -globulinas acompañado de una hipoalbuminemia. Las α -globulinas se encuentran, en casi todos nuestros pacientes, dentro del rango fisiológico (figura P.I.A.2.e). Como nosotros, Slappendel (1988) y Varela (1992) observan que las α -globulinas contribuyen poco a la hiperglobulinemia (Slappendel, 1988; Varela, 1992).

Las **variables del eritro y del leucograma**, en el momento del diagnóstico de nuestros casos, mostraron predominantemente valores dentro del rango fisiológico (figura P.I.A.2.i-o). Aunque, en general, se describe la presencia casi constante de una anemia moderada y no regenerativa (Rodríguez *et al*, 1984; Keenan *et al*, 1984; Ferrer, 1992; Binhazim *et al*, 1993; Gascón, 1994), algunos detectan anemia, al igual que nosotros, en una proporción relativamente baja (20-30%) (Giauffret *et al*, 1976; Cabassu, 1988b; Crende *et al*, 1992; Denerolle, 1996).

Nuestros hallazgos, en concordancia con ciertos autores (Cabassu, 1988b; Varela, 1992), reflejan la ausencia de modificaciones en el leucograma, en la mayor parte de los casos. No obstante y aunque en un número reducido de animales, observamos alteraciones tanto por exceso como por defecto en los distintos tipos celulares de la fórmula leucocitaria, alteraciones igualmente señaladas en la bibliografía. Así, distintos autores consideran la presencia de una ligera leucopenia (Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1977; Rodríguez *et al*, 1984; Keenan *et al*, 1984; Slappendel, 1988; Ferrer, 1992; Franc, 1993; Bourdoiseau, 1993; Binhazim *et al*, 1993) y la inversión de la fórmula, debido a un aumento de los linfocitos y una disminución de los neutrófilos (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Binhazim *et al*, 1993), como las perturbaciones más frecuentes en el leucograma. En cambio, en otros trabajos se observa linfopenia (Martínez *et Lloret*, 1992).

La presencia de leucocitosis (Giauffret *et al*, 1976; Ferrer, 1992), asociada a neutrofilia, se ha relacionado con la existencia de lesiones cutáneas (Giauffret *et al*, 1976), renales (Groulade, 1977) o digestivas (Cabassu, 1988b) secundarias a sobreinfección. Asimismo se ha descrito la presencia de monocitosis (Cabassu, 1988b; Martínz *et Lloret*, 1992; Franc, 1993; Bourdoiseau, 1993) y, de forma inconstante, de eosinofilia (Sanchís *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Cabassu, 1988b ; Martínz *et Lloret*, 1992). Sin embargo, en nuestro estudio el descenso por debajo de los límites fisiológicos en estos dos tipos de leucocitos fue más frecuente que su aumento.

I.B –. CARACTERIZACION

De las asociaciones encontradas, en el momento del diagnóstico, entre las distintas variables (cualitativas y cuantitativas) consideradas en el estudio prospectivo, destaca la estrecha correlación entre el título de anticuerpos y las fracciones del proteinograma que suelen verse más alteradas en esta enfermedad (proteínas totales, albúmina, γ -globulinas y cociente Alb/Glo) (tabla P.I.B.2.1). Por otra parte, el cuadro clínico muestra una asociación significativa con dichas fracciones del proteinograma, siendo sus alteraciones más marcadas para el cuadro mixto y menos para el cuadro asintomático, con respecto a las medias de la muestra global. Además, se encuentra una asociación significativa entre el cuadro asintomático y la tasa de anticuerpos (tabla P.I.B.1.4).

Todos estos resultados ponen de manifiesto, coincidiendo con Carrera y col. (1996) (Carrera *et al*, 1996) y con Roze (1990) (Roze, 1990) y en contra de las observaciones de otros autores (Vitu *et al*, 1973; Sanchís *et al*, 1976; Ferrer, 1995), una correlación clara entre el **título de anticuerpos y las proteínas plasmáticas**, en particular, la albúmina y las γ -globulinas. A pesar de que Giauffret (1976) aprecia una tasa de anticuerpos más elevada en las formas viscerales graves de la enfermedad que en las formas cutáneas de evolución lenta (Giauffret *et al*, 1976), en nuestro estudio sólo hemos encontrado una relación significativa entre la presencia o no de sintomatología y la tasa de anticuerpos. A al igual que nosotros, otros muchos autores no han podido establecer una asociación entre el título de anticuerpos y la intensidad o gravedad de las lesiones (Dunan, 1978; Lanotte *et al*, 1979; Mancianti *et al*, 1988; Abranches *et al*, 1991a; Vercamen *et De Deken*, 1996; Denerolle, 1996).

Sin embargo, la existencia de una asociación entre **la intensidad de la sintomatología y el grado de alteración del proteinograma**, en concordancia con las observaciones de Giauffret y col. (1976) (Giauffret *et al*, 1976) y Catarsini (1989) (Catarsini, 1989), fue evidente.

Por otra parte, también nos parece relevante destacar el hecho de haber encontrado asociaciones significativas entre los **parámetros de la serie roja** y la fase de la enfermedad (aunque siempre dentro de los rangos fisiológicos, los valores medios fueron más elevados en las fases iniciales y más bajos en las fases de estado) (tabla P.I.B.1.3). De igual forma, el eritrograma se correlacionó significativamente con las distintas fracciones del proteinograma (proteínas totales, albúmina, γ -globulinas y cociente Alb/Glo) así como con el título de anticuerpos (tabla P.I.B.2.1). Esta correlación entre eritrograma y proteinograma ha sido previamente señalada por Gascón (1994) (Gascón, 1994).

En el estudio prospectivo, los valores iniciales del eritrograma fueron más bajos cuanto más elevados fueron los títulos de anticuerpos y más evidentes las perturbaciones del proteinograma, lo que se correspondería con la mayor afección de la serie roja a medida que avanza la enfermedad (Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1977; Kennan *et al*, 1984; Rodríguez *et al*, 1984; Franc, 1993). Recientemente, Aceña y col. (1997) han relacionado la intensidad de la anemia con el grado de carga parasitaria de la médula ósea (Aceña *et al*, 1997).

La correlación estadísticamente significativa encontrada entre la serie blanca (a excepción de los linfocitos) y las β -globulinas, por lo que sabemos, no ha sido descrita previamente y, de hecho, nosotros no hemos podido encontrar una explicación a este hallazgo.

La presencia de un aumento en las α_2 -globulinas se ha asociado con la existencia de afección renal (Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1977; Rodríguez *et al*, 1984), lo que explicaría la correlación entre la urea y las α -globulinas observada en nuestro estudio prospectivo. Asimismo, la existencia de valores de α -globulinas inferiores a los valores medios, en las fases iniciales de la enfermedad, se correspondería con las aportaciones de algunos autores que asocian la presencia de un pico en esta fracción con la presencia de focos de necrosis y lesiones orgánicas secundarias (Groulade, 1988) que están prácticamente ausentes en estas fases de la enfermedad.

II - DESCRIPCION DE LOS TRATAMIENTOS

De todos es bien conocida, y así lo refleja la bibliografía, la gran diversidad de fármacos y pautas terapéuticas empleados en el tratamiento de la leishmaniosis (Euzéby, 1982; Tassi, 1989; Ferrer, 1997b). Incluso, algunos profesionales utilizan más de un protocolo de tratamiento en la lucha frente a esta enfermedad (Crende *et al*, 1992; Roze *et Pages*, 1994; Tesouro *et al*, 1995c; Denerolle, 1996). Las razones de una actitud terapéutica tan dispar podría deberse a múltiples factores tales como la gran variabilidad en la respuesta al tratamiento por parte de cada animal, la distinta disponibilidad de los propietarios, la constante preocupación por el posible riesgo de transmisión así como a los diferentes criterios y experiencia del profesional encargado del caso.

Aunque, en la actualidad, los tratamientos frente a la leishmaniosis canina aplicados en la Facultad de Veterinaria de Madrid tienden a ser uniformes, supeditándose esta uniformidad casi exclusivamente al estado general del animal, no siempre se ha seguido esta práctica. Por consiguiente, no es extraño que encontrásemos el empleo de distintos protocolos terapéuticos al revisar las historias clínicas para nuestro estudio retrospectivo, a pesar de que el fármaco específico mayoritariamente empleado fuera el Glucantime®.

Esta pluralidad de protocolos de tratamiento (en cuanto a dosis, periodos de administración, etc.), incluso en un mismo caso clínico, resultó más manifiesta cuando revisamos las historias clínicas más antiguas y fue un factor limitante a la hora de seleccionarlas para nuestro estudio. Con el paso del tiempo y la obtención de resultados los protocolos fueron haciéndose más homogéneos, aunque a menudo se han visto sujetos a la evolución y circunstancias de cada caso particular.

El número total de fichas revisadas, con un diagnóstico de leishmaniosis, fue superior a 400 y de ellas más del 60% reflejaban la instauración de una terapia específica. Sin embargo, sólo 104 casos fueron incluidos en este estudio, ya que exigíamos que las historias recogieran, además de la administración de un tratamiento metódico, el seguimiento detallado del caso.

Los 104 casos clínicos que, finalmente, fueron incluidos en nuestro estudio retrospectivo tenían en común la utilización de Glucantime® (a distintas dosis) como fármaco específico administrado por vía IM en ciclos de 20 inyecciones (con distintas pautas: dos tandas de 10 días separadas por 7-10 días de descanso, días alternos, días consecutivos, etc). La distinta posología administrada por inyección hizo necesaria la clasificación de los casos en dos categorías en función de la dosis recibida por inyección, que denominamos dosis altas (G1) y dosis bajas (G2). Además, dentro de cada uno de estos dos grupos encontramos algunos casos en los que el antimonial se asociaba al empleo de Zyloric® por vía oral. Esta asociación fue igualmente considerada como un criterio de clasificación.

Los casos incluidos quedaron distribuidos en cuatro grupos atendiendo al protocolo terapéutico recibido (G1, G1+Z, G2 y G2+Z), como se describe en materiales y métodos. Independientemente de la pauta terapéutica seguida, los ciclos de tratamiento fueron repetidos hasta alcanzar la remisión clínica y biopatológica (valorada, principalmente, a través del proteinograma y del título de anticuerpos). Esta práctica, observada como un procedimiento habitual por parte del equipo de profesores que atendían los casos, ha facilitado enormemente la valoración de la respuesta terapéutica, ya que contábamos con una homogeneidad de criterios tanto para cesar el tratamiento como para reiniciarlo en caso de recidiva.

En la historia de algunos casos revisados y antes de haberse establecido el diagnóstico de leishmaniosis por métodos específicos se describe el empleo de **tratamientos sintomáticos** como antiinflamatorios (esteroideos y no esteroideos) en cojeras, soluciones tópicas en lesiones cutáneas, hemostáticos en epistaxis, antibioterapia, etc. que, salvo ciertas y ligeras mejorías, en ningún caso proporcionaron resultados satisfactorios. Algunos de estos tratamientos sintomáticos fueron igualmente instaurados (o mantenidos) una vez establecido el diagnóstico de leishmaniosis.

Considerando los escasos efectos beneficiosos (Mendoza *et al*, 1983; Ferrer, 1992; Font *et a*, 1993b) de este tipo de medicación, pensamos que la mayor parte de las veces no sería necesaria ni estaría justificada la terapia sintomática tan frecuentemente empleada en la práctica clínica (Euzeby, 1982; Martínez *et Lloret*, 1992; Tesouro *et al*, 1995c). La excepción a esta norma estaría constituida por los casos graves con complicaciones orgánicas importantes, fundamentalmente, insuficiencia hepática y, sobre todo, insuficiencia renal. Particularmente en estos supuestos, previa a la instauración de la terapia específica y con el fin de estabilizar al paciente, estaría indicado el empleo del correspondiente tratamiento sintomático (higiénico-dietético y medicamentoso) (Varela, 1992; Franc, 1993; Roze *et Pages*, 1994). Asimismo, la uveítis necesitaría ser tratada independientemente del tratamiento específico (Roze, 1992; Varela, 1992), ya que, a menudo, la uveítis no responde al tratamiento antimonial (con o sin alopurinol).

La vía **subcutánea**, para la administración de Glucantime®, ha sido recientemente considerada como una clara alternativa (Roze *et al*, 1994; Tassi, 1994; Valladares *et al*, 1996; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b) a las vías que habitualmente han venido usándose para la aplicación de la estiboterapia (IM e IV) (Ferrer, 1992; Tesouro *et al*, 1995c). Pocas eran las referencias a su empleo cuando nos planteamos valorar su eficacia (Slappendel, 1988; Bergeaud, 1988; Crende *et al*, 1992; Tesouro *et al*, 1995c) e, incluso, el propio laboratorio fabricante no contemplaba, entonces, el empleo de esta vía (Vademecum de Veterinaria Garsi 92, 1992). Las ventajas de la administración SC serían, además de las derivadas de la farmacocinética del antimonial (Tassi *et al*, 1994; Valladares *et al*, 1996), la posibilidad de que el tratamiento sea aplicado por el propietario y la reducción del riesgo de enquistamiento o tumefacción local (Slappendel, 1988; Crende *et al*, 1992) y de los efectos traumáticos consecutivos a los prolongados tratamientos a base de repetidas inyecciones intramusculares de volúmenes considerables, en particular, en aquellos animales en los que su masa muscular se encuentra notablemente disminuida.

Para valorar la eficacia terapéutica de la vía SC, adoptamos la **pauta terapéutica** y los **criterios de control del tratamiento** que, en los últimos años y de forma rutinaria, se venían siguiendo en las consultas de nuestra Facultad. Por ello, en nuestro estudio prospectivo, utilizamos el protocolo a base de dosis altas de Glucantime® (150 mg/kg/día, vía SC) asociadas a Zyloric®, descrito en el capítulo de materiales y métodos. Este protocolo encajaría dentro de los que están utilizando otros clínicos (Tesouro *et al*, 1995c) y que, actualmente, recomienda el fabricante de Glucantime® (Guía de Productos zoonosanitarios Veterindustria, 1994).

Aunque el laboratorio productor de Zyloric® no contempla (según las indicaciones del prospecto) su aplicación para el tratamiento de la leishmaniosis (Vademecum Internacional, 1997), distintos estudios *in vitro* e *in vivo* (Berens *et al*, 1980; Peters *et al*, 1980; Looker *et al*, 1986) han puesto en evidencia su eficacia frente a esta enfermedad y, en la actualidad, son cada vez más los autores que lo incluyen en sus protocolos aunque, generalmente, lo administran durante periodos de tiempo más largos (Tesouro *et al*, 1995c; Vercamen *et al*, 1996; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b) que nosotros.

Con el fin de alcanzar nuestros objetivos utilizamos pautas y parámetros de valoración sencillos cuyo empleo, si no es práctica generalizada en cualquier clínica veterinaria, podría ser aplicado de forma inmediata sin grandes inconvenientes. De hecho, algunos de estos parámetros (síntomatología, título de anticuerpos y/o proteinograma) son habitualmente empleados en el seguimiento y control de la enfermedad (Giaffret *et al*, 1976; Dunan, 1978; Euzeby, 1988; Groulade, 1988; Cairó *et al*, 1991; Tesouro *et al*, 1992b; Roze *et al*, 1994; Tesouro *et al*, 1995c; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b).

III - RESPUESTA A CORTO PLAZO

Una vez caracterizadas nuestras muestras el primer interrogante que nos planteamos fue valorar la respuesta a la terapia observada durante e inmediatamente después de recibir un ciclo de tratamiento, es decir, dentro de los dos meses siguientes a la instauración de la terapia, que denominamos respuesta a corto plazo.

La valoración de dicha respuesta podría ser de una gran utilidad práctica, ya que nos orientaría acerca de la evolución del paciente y nos permitiría establecer unas primeras estimaciones sobre su porvenir y contestar lo antes posible a las cuestiones que, a menudo, nos plantean los propietarios de los perros diagnosticados de leishmaniosis (efectividad del tratamiento, coste económico, complicaciones y efectos secundarios esperados, etc.).

Además, según nuestra experiencia existe una gran variabilidad en la efectividad de la terapia dentro de las primeras semanas de instaurada ésta. Posteriormente, con la prolongación del tratamiento o la repetición de nuevos ciclos, los resultados suelen ser más homogéneos. Esta variabilidad en la respuesta ha sido igualmente señalada en medicina humana. Thakur (1988) observa pacientes humanos (kala-azar) que inicialmente no responden pero que llegan a curar tras la prolongación del tratamiento (Thakur *et al*, 1988). Ante estas evidencias (distintas respuestas a corto plazo pero evoluciones similares a más largo plazo) nos planteamos analizar, caracterizar y comparar la respuesta terapéutica a lo largo de todo el tiempo de seguimiento.

III.A – EFECTOS COLATERALES AL TRATAMIENTO

Antes de entrar a discutir la respuesta a corto plazo (comparando los distintos protocolos terapéuticos) consideramos interesante hacer algunos comentarios a propósito de los efectos colaterales observados en el estudio prospectivo (ya que esta información no pudo ser obtenida en el retrospectivo). La bibliografía cita un número importante de efectos secundarios al empleo de antimonioales (Vitoria, 1984; Rodríguez *et al*, 1984; Euzeby, 1988; Mattot *et al*, 1992; Roze *et Pages*, 1994; Denerolle, 1996), mientras que el alopurinol daría lugar a pocos y ligeros efectos indeseables (Nelson *et al*, 1979; Croft, 1988; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b).

Con nuestro protocolo, hemos detectado el desarrollo de media docena de tales efectos (figura P.II.A.a). Probablemente, el más frecuente fue la aparición de **apatía** pocos días después de iniciada la terapia, aunque tan sólo en cuatro casos llegó a producirse un empeoramiento del estado general con **decaimiento intenso**. Esta reacción, observada también por otros autores (Franc, 1993; Denerolle, 1996), ha sido atribuida a la liberación masiva de antígenos parasitarios (Bourdoiseau, 1993) y, aunque Denerolle (1996) cesa el tratamiento durante 5 días cuando se produce esta eventualidad (Denerolle, 1996), no parece que tal interrupción sea generalmente necesaria (Bourdoiseau, 1993) y, de hecho, nuestros 4 casos superaron este empeoramiento sin que el protocolo terapéutico prescrito inicialmente fuera alterado.

La aparición de **nódulos** de distinto tamaño (de unos mm a varios cm) durante el primer ciclo de tratamiento fue evidente en cuatro de los 61 casos del estudio prospectivo. Slappendel (1988) también ha descrito la aparición de pequeños nódulos palpebrales asociados a queratitis e iridociclitis así como el desarrollo de uveítis tras la instauración del tratamiento, que surgirían como consecuencia de la inversión de un estado anérgico a un estado alérgico (Slappendel *et Greene*, 1990) y podrían ser comparables a la leishmaniosis dérmica post-kala-azar (Slappendel, 1988) descrita en el hombre (Sierra, 1981; El Hassan *et al*, 1992; Zijilistra *et al*, 1993; Ramesh, 1996; Gasim *et al*, 1997).

A pesar de que algunos de los nódulos observados en nuestro estudio son de un tamaño considerable y de localización diversa, podrían haber aparecido como consecuencia del mismo mecanismo. Gassim y col. (1997) han sugerido que el mecanismo por el cual se producirían las lesiones cutáneas en pacientes tratados de kala-azar, aparentemente con éxito, implicarían a las células Th1 que dirigirían un ataque inmunológico sobre los parásitos que hubieran sobrevivido en la piel (Gassim *et al*, 1997).

No hemos podido encontrar protozoos en las muestras procedentes de estos nódulos. Esto podría ser debido a la existencia de una baja carga parasitaria (El Hassan *et al*, 1992; Gasim *et al*, 1997). Quizás el empleo de técnicas inmunohistoquímicas (Ferrer *et al*, 1988a) nos hubiera permitido detectar la presencia de amastigotes en las preparaciones. En nuestros casos los nódulos desaparecieron antes de finalizar el ciclo de tratamiento, mientras que en el hombre este tipo de lesiones pueden remitir espontáneamente al cabo de unos meses (Gasim *et al*, 1997) o persistir durante muchos años (Ismail *et al*, 1997).

Según Roze y Pages (1994) la **intolerancia en el punto de inyección** sería el principal efecto secundario del Glucantime® cuando se aplica por vía SC (Roze *et Pages*, 1994) y, de hecho, Denerolle (1996) encuentra induración y reacción edematosa local en el punto de inoculación en 18 de 61 casos (Denerolle, 1996). Posiblemente para reducir este riesgo el laboratorio fabricante recomienda que, de emplearse esta vía, se diluya previamente el medicamento en suero isotónico al 50% (Guía de Productos zoosanitarios Veterindustria, 1994). Nosotros, sin embargo, administrándolo a la concentración original detectamos enquistamiento local y pasajero tan sólo en dos de los 61 casos tratados subcutáneamente.

En cuanto al efecto nefrotóxico clásicamente atribuido a los antimoniales (Rodríguez *et al*, 1984; Euzebly, 1988), hay que precisar que en nuestro estudio sólo se consideró la posibilidad de este efecto se produjera en los animales que iniciaron el tratamiento con valores fisiológicos de urea y creatinina (figura P.I.A.2.p).

De éstos, sólo un caso desarrolló un **fallo renal** a los pocos días de instaurada la terapia, lo que pone de manifiesto la baja probabilidad de que el empleo de Glucantime® a las dosis administradas en nuestro estudio prospectivo provoque una insuficiencia renal. Incluso el agravamiento de la afección renal en los animales que parten con un fallo renal previo podría acelerarse, tras la instauración del tratamiento, debido a mecanismos inmunomediados más que por la acción directa del fármaco específico.

Aunque se observa una ligera elevación post-tratamiento de los niveles medios de ALT (tabla P.III.B.9), ninguno de los casos desarrolló insuficiencia hepática atribuible a la terapia. Sin embargo, los animales que presentaban afección hepática en el momento del diagnóstico, tardaron más tiempo en responder o no respondieron favorablemente al tratamiento.

Al realizar la caracterización de los efectos colaterales con respecto al resto de las variables consideradas en el momento del diagnóstico sólo hallamos asociación significativa con las **α -globulinas** (aunque los valores medios de esta fracción del proteinograma se mantuvieron dentro del rango fisiológico) (tabla P.II.A.1).

Los aumentos de las α -globulinas (debidos a un aumento de la fracción α -2-globulinas) son considerados marcadores de procesos inflamatorios (Coles, 1986; Kaneko, 1989). Asimismo, en la leishmaniosis, algunos autores han asociado las elevaciones de dicha fracción, no sólo con la existencia de una afección renal (Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1977; Rodríguez *et al*, 1984), sino también con la presencia de focos de necrosis o inflamación (Groulade, 1988), así como con periodos de diseminación de la enfermedad (Groulade, 1983; Rodríguez *et al*, 1984).

Esto sugiere que en estos animales la carga parasitaria podría ser mayor y sería posible que la instauración del tratamiento provocase una destrucción masiva del parásito que desencadenaría la presentación de fenómenos inmunomediados y se acompañaría de la formación de grandes cantidades de inmunocomplejos, los cuales podrían ser responsables de la presentación de distintos tipos de efectos secundarios, tales como el decaimiento, formación de nódulos, etc. En medicina humana, incluso, se ha descrito un caso en el que paciente desarrolló un fracaso multiorgánico igualmente atribuido a una respuesta inmunitaria exacerbada (Mesejo *et al*, 1993).

III. B –. COMPARACION DE LA RESPUESTA A CORTO PLAZO

En primer lugar quisimos averiguar si, independientemente de cualquier otra circunstancia, la respuesta terapéutica obtenida a corto plazo variaba según el protocolo empleado.

Dentro del estudio retrospectivo comprobamos cómo tales respuestas son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según el protocolo terapéutico empleado (tabla R.II.A.1). En principio, tales diferencias no pueden atribuirse a la administración o no de alopurinol (tablas R.II.A.2 y R.II.A.3) y sí a las distintas dosis de Glucantime® utilizadas en el tratamiento, obteniéndose más de un 62% (44/70 casos) de respuestas muy favorables cuando se emplearon dosis de antimonio de meglumine entre 100-150 mg/kg/día (G1/G1+A) frente al 29.4% (10/34 casos) de respuestas muy favorables observado con dosis de 50-100 mg/kg/día (G2/G2+A) ($p < 0.01$) (tabla R.II.A.4).

En esta línea Crende y col. (1992) tienen mejores respuestas terapéuticas administrando Glucantime® (SC) a dosis de 150-200 mg/kg/48h que con dosis de 40-60 mg/kg/48h (ambos protocolos aplicados en series de 15 inyecciones) (Crende *et al*, 1992). Asimismo, distintos estudios realizados en pacientes humanos afectados de kala-azar (*L.donovani*) han puesto de manifiesto una diferente reducción inicial en la carga parasitaria de los órganos linfoides según la dosis diaria de antimonial administrada (Chulay *et al*, 1983; Zijilistra *et al*, 1993).

El empleo de Glucantime® por vía subcutánea proporciona resultados similares a los obtenidos por la vía intramuscular cuando se emplean dosis similares del antimonial (32/61 de respuesta muy favorables empleando la vía SC y 44/70 con la aplicación IM) (tabla P.II.B.1), lo que confirma que la eficacia terapéutica a corto plazo es independiente de que la estiboterapia se administre por una u otra vía, como así lo han sugerido distintos autores (Valladares *et al*, 1996; Ferrer, 1997a).

Según nuestros resultados el tipo de respuesta a corto plazo es independiente de la edad y del sexo del paciente coincidiendo con las observaciones de Denerolle (1996) (Denerolle, 1996), tanto dentro de cada protocolo terapéutico como cuando se consideran conjuntamente (tablas P.II.D.1-2, R.II.C.1-5 y R.II.D.1-5). Esta comprobación, no obstante, nos parecía interesante ya que, como previamente se ha comentado, algunos autores indican la existencia de distintas tasas de morbilidad con respecto a estas dos variables, con un predominio de los machos sobre las hembras (Tesouro, 1984a) y de la población adulta (Abranches *et al*, 1991a), lo que podría suponer una distinta sensibilidad al proceso y, por extensión, a la terapia. Asimismo, Brabin y Brabin (1992) en un amplio trabajo de revisión sobre enfermedades parasitarias en las mujeres, recopila observaciones de otros autores que, en su conjunto, podrían sugerir una mejor respuesta de éstas a la terapia frente al kala-azar que los hombres (Brabin *et Brabin*, 1992).

En lo que se refiere a la edad, hasta hace unos años la población más afectada era la infantil (Vitoria, 1984)(Ministerio de Sanidad y Consumo, 1986), mientras que en la actualidad, la incidencia es mayor en individuos adultos VIH positivos (Mary *et Le Fichoux*, 1988; OMS, 1990; Gradoni *et al*, 1995; Alvar *et al*, 1997)(OTRAS REFERENCIAS). Así, las investigaciones más recientes parecen demostrar que la susceptibilidad a padecer la enfermedad se asociaría principalmente con el estado inmunitario que presente el individuo (Killick-Kendrick *et al*, 1994; Pinelli *et al*, 1994; Pal *et al*, 1995).

Muchas publicaciones han puesto de manifiesto las diferencias en la respuesta a la terapia según la intensidad de los síntomas, el estado general y el grado de afección orgánica que presente el animal en el momento de instauración del tratamiento (Berenger, 1988; Mancianti *et al*, 1988; Tassi, 1989; Tesouro *et al*, 1995c). Para confirmar estas evidencias y poder interpretar correctamente los resultados de nuestro estudio, los casos clínicos fueron clasificados, como ha quedado expuesto en materiales y métodos, en tres grupos atendiendo a la patocronia de la enfermedad, según los criterios descritos por Tesouro y col. (1992b) (Tesouro *et al*, 1992b): Fase I, Fase E y Fase A.

El análisis estadístico de nuestros datos confirma que las respuestas obtenidas difieren muy significativamente ($p < 0.01$) según la **fase de la enfermedad** en la que se instaure el tratamiento. Así, considerando conjuntamente toda nuestra colección de casos, se observa cómo la inmensa mayoría de los perros diagnosticados en fase avanzada (principalmente con fallo renal y/o, en menor grado, hepático) (21/28=75%) presenta una respuesta desfavorable. Por el contrario, los mayores porcentajes de respuestas muy favorables se detectan en el grupo de animales que inician el tratamiento en periodos de incubación y fases iniciales de la enfermedad (38/43=88.37%). En la población tratada en fase de estado este tipo de respuesta (muy favorable) se observa en una proporción significativamente inferior de casos (47/94=50%) (tabla R.II.B.1 y P.II.C.1).

De igual forma confirmamos mediante el test de χ^2 que estas diferencias en la respuesta a corto plazo se mantienen, según la fase de la enfermedad, dentro de cada grupo terapéutico (G1/G1+Z, G2/G2+Z y G1+Z-SC) considerado por separado (tabla R.II.B.2 y R.II.B.3 y tabla P.II.C.1).

Por último, dentro de este apartado, encontramos que al comparar los distintos tratamientos aplicados dentro de cada fase de la enfermedad, el tipo de respuesta a corto plazo, en la población diagnosticada en **fase inicial** es independiente del protocolo empleado (tabla R.II.B.6 y tabla P.II.C.2). Por el contrario, dentro de la muestra canina tratada en fases de estado, se detectan diferencias estadísticamente significativas en el tipo de respuesta según se administren dosis bajas o altas de Glucantime® (tabla R.II.B.7), obteniéndose una proporción de respuesta muy favorable claramente superior con la pauta G1/G1+Z (24/39) que con el protocolo G2/G2+Z (4/20). Sin embargo, la respuesta de los animales tratados en fase de estado no depende de la vía de administración del Glucantime® (al menos, cuando éste se utiliza a dosis altas), con unas tasas de respuesta muy favorable similares entre la aplicación SC (24/39) y la IM (19/35) (tabla P.II.C.3).

En resumen, nuestros resultados indican que el 75% (21/28) de los perros en fase avanzada de la enfermedad, independiente del protocolo terapéutico recibido, muestran una respuesta a corto plazo desfavorable. El 88.37% (38/43) de los casos en fase inicial presenta una respuesta muy favorable, igualmente de forma independiente al tratamiento recibido. Dentro de los pacientes diagnosticados en fase de estado, el 58.11% (43/74) de los animales que reciben dosis altas de Glucantime®, con independencia de la vía de administración, responden muy favorablemente, mientras que este tipo de respuesta a corto plazo (muy favorable) tan sólo se observa en un 20% (4/20) de los casos que son tratados con dosis bajas del antimonial, independientemente de su asociación con Zyloric®.

IV - EVOLUCION DE LOS CASOS CLINICOS

En este apartado abordamos la evolución de los casos clínicos del estudio *retrospectivo* y del *prospectivo* a lo largo del tiempo de seguimiento, centrándonos particularmente en la población que alcanzó la remisión.

En la bibliografía consultada las premisas que definen la consecución de la remisión, es decir, la obtención del efecto beneficioso que se pretende conseguir tras la instauración de la terapia y que determina la cesación de ésta, no son homogéneas. En este sentido, nuestros criterios para admitir que se ha alcanzado la remisión podrían calificarse de intermedios entre los citados en la literatura.

Consideramos la “remisión” estrictamente clínica (desaparación de los síntomas) (Slappendel, 1988; Lamothe, 1997) insuficiente para calificarla como tal, si no se acompaña de una normalización de los parámetros biopatológicos. De entre éstos, el proteinograma es considerado, por muchos, como el más sensible para la valoración de la respuesta terapéutica (Vitu *et al*, 1973; Sanchís *et al*, 1976; Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1981; Groulade, 1988; Cairó *et Font*, 1991; Martínez *et Lloret*, 1992; Ferrer, 1997a).

Por el contrario, el criterio que impone la obtención de títulos de anticuerpos específicos negativos (no significativos) (Berenger, 1988; Bergeaud, 1988; Roze *et Pages*, 1994; Denerolle, 1996) o de tasas de anticuerpos muy bajas (Euzéby, 1988), para considerar la consecución de la remisión (o, más bien, la curación) y, por tanto, para dar por finalizado el tratamiento, nos parece excesivamente exigente.

Según distintos autores las tasas de anticuerpos rara vez descienden por debajo de los umbrales de positividad (Giauffret *et al*, 1976; Euzeby, 1988; Roze *et Pages*, 1994), si bien en los casos con respuesta favorable al tratamiento se observa un descenso progresivo de los mismos, cuando se emplea la técnica de la inmunofluorescencia indirecta (Dunan, 1978; Euzeby, 1988; Roze *et Pages*, 1994; Denerolle, 1996; Vercamen *et De Deken*, 1996).

Para este estudio, tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos, acordamos mantener los criterios que, de forma habitual, se venían siguiendo en nuestro Departamento para admitir la consecución de la remisión. Tales criterios incluyen la desaparición de la sintomatología, la normalización del proteinograma y el descenso significativo del título de anticuerpos.

La minuciosidad con que se llevó a cabo el estudio terapéutico prospectivo desveló la imposibilidad de lograr el cumplimiento de estas premisas en la totalidad de los casos en los que se admitió la remisión. Los resultados demuestran que en un número reducido de animales no se alcanzan completa y/o simultáneamente los tres requisitos que definen la remisión. Observamos cómo, en ocasiones, no llegan a resolverse por entero algunos síntomas (particularmente algunas lesiones en los pabellones auriculares y la uveítis (Roze, 1990; Varela, 1992; Lamothe, 1997)) o no se consigue una normalización completa del proteinograma (en casos con afección orgánica crónica o con procesos concurrentes (Sainz *et al*, 1993; Núñez-Torrón *et al*, 1996), etc.).

La tasa de anticuerpos muestra un descenso significativo (dos diluciones) en la mayoría de los nuestros pacientes, aunque en algunos casos (13/48) este descenso se registra en el control inmediatamente posterior a la remisión. En nuestra opinión, el cumplimiento estricto de dos de los requisitos, junto con una tendencia favorable del tercero sería suficiente, en algunos casos, para considerar que se ha alcanzado la remisión y, por tanto, para dar por finalizado el tratamiento.

Al analizar los casos incluidos en nuestros estudios a más largo plazo, lo primero que comprobamos es que el tipo de evolución (hacia el agravamiento, el mantenimiento o la remisión) observada, está en concordancia con el tipo de respuesta inicial al tratamiento.

IV.A -. EVOLUCION HACIA EL AGRAVAMIENTO

Como demuestran nuestros resultados, los perros que evolucionan hacia el agravamiento se encuentran en su mayoría en **fases avanzadas** (21/29) y presentan una respuesta terapéutica desfavorable a corto plazo (28/29), con independencia del protocolo empleado. Tan sólo en un caso del estudio retrospectivo la respuesta inicial fue clasificada como nula (tabla R.III.A.1.1).

La caracterización de este grupo en el estudio prospectivo (tabla P.III.A.1.1) revela que la mayoría de los animales que evolucionan hacia el agravamiento (respuesta a corto plazo desfavorable) se encuentran, en el momento del diagnóstico, en fases avanzadas de la enfermedad con **fallo renal** y elevaciones patológicas de la urea y de la creatinina, acompañadas de un descenso importante de la concentración de albúmina plasmática y del cociente Alb/Glo.

Aunque dentro del rango fisiológico, los valores medios de las α -globulinas, de los glóbulos blancos y, dentro de éstos, de los neutrófilos están significativamente aumentados con respecto a la población global. Todos estos hallazgos han sido previamente descritos por otros autores.

Efectivamente, a menudo se ha puesto de manifiesto cómo los animales en fases avanzadas de la enfermedad, fundamentalmente representada por la presencia de fallo renal (con elevación de la urea y la creatinina) evolucionan, en su mayoría, desfavorablemente (Slappendel, 1988; Naskidachvilli *et Peroux*, 1988; Catarsini, 1989; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992). Por otra parte, en estas fases el proteinograma suele estar muy alterado y la albúmina muy baja debido al deterioro orgánico (fundamentalmente renal) existente (Tesouro, 1992b). La presencia de un pico en las α_2 -globulinas se ha asociado, como se comentó anteriormente, con fallo renal (Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1977; Rodríguez *et al*, 1984). Por último, la presencia de una leucocitosis asociada a neutrofilia aparecería como consecuencia de sobreinfecciones secundarias (Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1977; Cabassu, 1988b).

De acuerdo con la bibliografía, en las formas graves de la enfermedad el empleo de distintas dosis de Glucantime® asociado o no alopurinol no otorga unos resultados satisfactorios (esperanzadores), ya que una proporción importante de los perros en fase avanzada no muestra una respuesta favorable (Tesouro *et al*, 1995c) o las lesiones (sobre todo en afección renal) se agravan (Slappendel, 1988; Ferrer, 1992).

De toda la serie de perros en fase avanzada (20 del estudio retrospectivo y 9 del estudio prospectivo) sólo en cuatro se alcanza la remisión; el resto murió o fue sacrificado durante el primer ciclo de tratamiento. El pronóstico de estos casos es, por tanto, más que reservado muy grave.

No obstante y aunque nuestras series son pequeñas, nos parece interesante matizar que la respuesta observada en todos los perros en fase avanzada que recibieron dosis bajas de Glucantime® fue desfavorable (tabla R.II.B.3 y R.II.A.1.1). En cambio, con dosis mayores del antimonial cuatro animales (dos tratados por vía SC y otros dos por IM) en esta fase de la enfermedad llegaron a remitir. Estos resultados estarían de acuerdo con los reflejados en la encuesta realizada entre los clínicos veterinarios de nuestra Comunidad, en la que se recogieron unos mayores porcentajes de mejoría (aunque siempre bajos), en los casos con insuficiencia renal, tratados con dosis altas de Glucantime®, especialmente cuando éste se asoció a Zyloric® (Tesouro *et al*, 1995c).

Por otro lado, hemos tenido la oportunidad de atender en nuestras consultas algunos perros leishmaniósicos (no incluidos en este trabajo) con un cuadro de insuficiencia renal tras haber recibido una terapia irregular a base de Glucantime® a dosis bajas o a intervalos de tiempo muy espaciados.

Basándonos en estas observaciones y contrariamente a lo que recomiendan otros autores (Euzeby, 1982; Franc, 1993; Denerolle, 1996) o el propio laboratorio (Guía de Productos Zoosanitarios Veterindustria, 1994), quizás en los casos en fase avanzada sería preferible comenzar con dosis altas (apropiadas al peso) y, en el supuesto de que la complicación renal se presentara (o empeorara), reducir la dosis o suspender el tratamiento específico sustituyéndolo por un tratamiento sintomático, lo que podría permitir en algunos casos una respuesta particular efectiva.

A pesar de todo esto, si nos atenemos estrictamente a los resultados de nuestros estudios el tratamiento con Glucantime® estaría desaconsejado (o limitado) por su escasa eficacia en los perros en fase avanzada y, en su lugar, deberían utilizarse o buscarse otros protocolos de tratamiento. Algunos autores emplean los corticoides como parte de la terapia para tratar de mejorar la respuesta terapéutica. Aunque los resultados no parecen ser excesivamente alentadores (Naskidachvilli *et Peroux*, 1988; Cairó *et Font*, 1991), Bergeaud (1988) consigue reducir los niveles de uremia hasta valores normales y los mantiene durante más de 18 meses en 6 de 9 perros con afección renal, asociando dosis de 100 mg/kg/48 h de Glucantime®/kg a prednisona (Bergeaud, 1988) y Denerolle (1996) obtiene supervivencias por encima de un año en 4 de 7 casos con insuficiencia renal, utilizando este mismo corticoide junto con alopurinol (Denerolle, 1996).

Para terminar con este apartado, mencionaremos que, dentro de este grupo (evolución hacia el agravamiento), se incluyeron algunos animales que fueron diagnosticados en fase inicial (1 del estudio retrospectivo) y de estado (1 del prospectivo y 6 del retrospectivo) de la enfermedad que, tras la instauración del tratamiento presentaron alguna complicación no siempre atribuible a la terapia o a la propia enfermedad.

IV.B -. EVOLUCION HACIA EL MANTENIMIENTO

En esta categoría incluimos los casos que tras la instauración del tratamiento presentaron periodos de cierta mejoría y/o deterioro, pero ni llegaron a alcanzar la remisión clínica ni tampoco sufrieron un drástico empeoramiento del proceso.

Esta serie constituida por 16 y 4 casos de los estudios retrospectivo y prospectivo respectivamente se corresponde principalmente con los perros cuya respuesta al tratamiento a corto plazo fue clasificada como **nula**. No obstante, la mitad de los animales del estudio retrospectivo incluidos en este grupo presentaron inicialmente una respuesta valorada como **favorable**.

La mayoría de estos casos se encontraban en **fase de estado** en el estudio retrospectivo (15 casos) y en **fase avanzada** en el prospectivo (3 casos) al iniciar la terapia. La caracterización de este grupo en el estudio prospectivo determinó la presencia de unos valores medios más elevados de ALT y más bajos de β -globulinas en la respuesta terapéutica a corto plazo nula con respecto a la media global (lo que sugeriría una hepatopatía crónica (Kaneko, 1989; Cornelius, 1989) (tabla R.III.A.2.2 y P.III.A.2.1)). Para la correcta interpretación de estos resultados, hay que precisar que este grupo estaba integrado por cuatro casos y sólo uno de ellos presentaba una insuficiencia hepática. Somos conscientes de que las alteraciones biopatológicas de este caso fueron lo suficientemente marcadas como para desviar los resultados hacia la significación estadística.

Tanto el tiempo de seguimiento como el número de ciclos de tratamiento administrados fue muy variable en estos perros aunque la mayor parte de ellos (en el estudio retrospectivo) no recibieron más que un ciclo.

La ausencia de una respuesta adecuada a la terapia, que impide que los animales incluidos en este apartado lleguen a alcanzar la remisión, podría ser debida a distintos factores.

La administración de tratamientos antimoniales inadecuados (insuficientes) en dosis y/o duración parece una causa importante en el fallo terapéutico tanto en el perro como en el hombre (Reiter, 1985; Brycesson *et al*, 1985a; Cairó, 1994; Eslami *et al*, 1996; Alvar *et al*, 1997). En este sentido, una posibilidad que debe ser considerada y que cada vez con mayor frecuencia se recoge en la literatura es el desarrollo de resistencias por parte del parásito (Grogl *et al*, 1992; Piarroux *et al*, 1996; Faraut *et Gambarelli*, 1997). Efectivamente, Grogl (1989) detecta *in vitro* la aparición de clones de *Leishmania spp.* resistentes al tratamiento empleando dosis crecientes y discontinuas de estibogluconato sódico (Grogl *et al*, 1989), lo que justificaría la recomendación de aplicar los tratamientos sin interrupciones (Tassi, 1989). Sin embargo, un estudio realizado a partir de perros naturalmente infectados (*L. infantum*) y tratados con uno o varios ciclos de Glucantime®, sugiere que las resistencias podrían producirse en las fases tempranas del tratamiento (Gramiccia *et al*, 1992).

Con todo, Thakur y col. (1988) sostienen que muchas de las resistencias descritas en la bibliografía podrían no ser tales, ya que un buen número de enfermos de kala-azar que inicialmente no responden a la terapia curan cuando se prolonga la misma (Thakur *et al*, 1988). Asimismo, Brycesson y col. (1985a) han observado cómo algunos pacientes refractarios al tratamiento muestran una respuesta favorable aumentando la dosis del antimonial (Brycesson *et al*, 1985a).

Otra causa de fallo terapéutico a menudo citada en la bibliografía es la ausencia de una respuesta inmunitaria eficaz (Iwobi *et al*, 1991; Ribera *et al*, 1996; Nabors *et Farrel*, 1996; Piarroux *et al*, 1996).

Por último, la existencia de procesos concurrentes no sólo puede contribuir al fallo en la terapia (Brycesson, 1985a; Zijilistra *et al*, 1993; Piarroux *et al*, 1996) sino que incluso es capaz de enmascarar una buena evolución tras la administración de Glucantime® (Cairó, 1993; Tesouro *et Sainz*, 1995; Núñez-Torrón *et al*, 1996). En estos casos se hace necesario el tratamiento de la patología asociada específica e independiente de la terapia frente a la leishmaniosis.

Sin descartar las demás posibilidades, sospechamos que en el estudio retrospectivo la falta de respuesta al tratamiento se debería mayoritariamente a la administración de **dosis insuficientes** de Glucantime® y/o a la presencia de **procesos concurrentes** que, lógicamente, no responden a los antimoniales, sobre todo, si tenemos en cuenta que la mayoría de estos casos se encontraban en fases de estado de la enfermedad.

Hay que contemplar la posibilidad de que en algunos individuos se hubieran dado ambas circunstancias simultáneamente, puesto que la ausencia de una respuesta eficaz tras la administración de un ciclo de tratamiento en animales que presentasen una concurrencia no diagnosticada podría haber conducido al abandono de la terapia. Esta idea se vería apoyada por la menor proporción de casos que evolucionan hacia el mantenimiento en el estudio prospectivo, en el cual los ciclos de tratamiento se repitieron hasta tres veces y la eventualidad de una enfermedad concurrente fue considerada. Además, la mayor parte de estos animales partían con una afección orgánica importante, por lo que su evolución habría sido mejor de lo que en principio cabría esperar.

IV.C -. EVOLUCION HACIA LA REMISION

Tanto en el estudio retrospectivo como en el prospectivo los casos que alcanzan la remisión se corresponden con los casos cuya respuesta a corto plazo fue **favorable o muy favorable**.

El análisis estadístico llevado cabo en el estudio prospectivo permite diferenciar y definir las características del grupo de animales que no alcanza la remisión frente a los que sí y, dentro de éste, los dos tipos de respuesta terapéutica observada a corto plazo. Cada una de estas respuestas se relaciona, en el momento del diagnóstico, con distintas modalidades de algunas variables cualitativas y con los valores de ciertas variables cuantitativas. Todas estas asociaciones parecen lógicas, ya que el grupo de perros en los que se observa la respuesta más favorable es, precisamente, el que parte con un menor grado de sintomatología y de alteraciones biopatológicas.

Aunque se observan ciertas diferencias en la consecución de la remisión entre las distintas pautas terapéuticas seguidas, en ningún caso llegan a ser estadísticamente significativas, por lo que el hecho de que se produzca o no la remisión es independiente de la dosis diaria recibida de Glucantime® (tabla R.III.B.3), de su vía de administración (IM o SC) (tabla P.III.B.2) y de su asociación o no a Zyloric® (tabla R.III.B.2). Según nuestros resultados la **tasa de remisión global** está en torno al 70% (116/165 casos).

A pesar de la abundante bibliografía acerca del tratamiento de la leishmaniosis, el número de trabajos que indican tasas concretas de remisión es relativamente bajo. Nuestros porcentajes de remisión son similares a los aportados por Catarsini (1989). Este autor señala una proporción de remisión entre el 65 y el 70% de los casos, sin especificar el protocolo empleado (Catarsini, 1989).

Denerolle (1996), por su parte, obtiene porcentajes de remisiones clínicas, utilizando el Glucantime® a dosis de 200 mg/kg/48 SC (en principio, indefinidamente hasta la consecución de títulos $\leq 1/50$ por IFI), algo inferiores, calculadas en un $52.94 \pm 8.56\%$ (18/34) de los casos y que se acompañan de reducciones en el título de anticuerpos por debajo del umbral de positividad en 11 de ellos. Hay que destacar que para conseguir esta negativización del título necesita un gran número de inyecciones (más de 100). Este mismo autor, cuando asocia el Glucantime® (100 mg/kg/día SC, 30-60 días) a alopurinol (10 mg/kg/8h indefinidamente según el título de anticuerpos), alcanza unas tasas de remisión muy superiores, el $81.48 \pm 7.47\%$ (22/27), aunque el porcentaje de casos en los que el título desciende por debajo del umbral de positividad resulta claramente inferior (2/27) (Denerolle, 1996).

En medicina humana, también se han obtenido algunos éxitos terapéuticos administrando alopurinol (Dellamonica *et al*, 1989) o asociándolo a los antimoniales (Chunge *et al*, 1985), en pacientes refractarios a la estiboterapia. En nuestro estudio no se ha podido constatar este claro aumento en las tasas de remisión al asociar alopurinol al tratamiento antimonial, si bien en nuestros protocolos la administración de Zyloric® fue más limitada en el tiempo.

Lamothe (1997), empleando sólo anfotericina B (a una dosis total > 6 mg/kg) llega a alcanzar remisiones clínicas (ya que no contempla la evolución de los parámetros biopatológicos) en un $86.36 \pm 7.32\%$ (19/22) de los casos, pero en este trabajo ninguno de los casos incluidos presentaba alteraciones en los valores de la creatinina en sangre ni en la densidad de la orina (Lamothe, 1997).

Una práctica habitual entre los clínicos veterinarios que emplean el Glucantime® como fármaco específico frente a la enfermedad es la repetición de los ciclos de tratamiento (Tassi, 1989; Cairó et Font, 1991; Roze et Pages, 1994; Mancianti et al, 1988; Tesouro et al, 1995c; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b). Esta administración repetida de los ciclos de tratamiento hasta la consecución de la remisión, igualmente contemplada en nuestro estudio, debe ser tenida en cuenta a la hora de interpretar los porcentajes de remisión obtenidos con los distintos protocolos empleados.

Aunque, como hemos dicho, los porcentajes de remisión obtenidos en los distintos grupos terapéuticos de nuestro estudio son similares, el análisis estadístico revela que el **número de ciclos** administrados hasta alcanzar dicha remisión es significativamente mayor (casi el doble) para el protocolo con dosis bajas que para el que utiliza dosis altas de Glucantime® (tabla R.III.B.4) y estadísticamente igual ($p \cong 1$) para las vías SC e IM (al menos cuando se aplican dosis altas de Glucantime®).

Al igual que en la respuesta a corto plazo la edad y sexo se muestran como factores independientes de la consecución o no de la remisión.

Por el contrario, la **fase de la enfermedad** en que se encuentre el animal en el momento de iniciar la terapia parece un factor decisivo para que llegue a remitir (tablas R.III.B.5 y P.III.1). Esto estaría en concordancia con las observaciones de Mancianti (1988) que obtiene un mayor porcentaje de curaciones serológicas en perros asintomáticos y una mejoría del estado clínico más pronunciada en oligo que en polisintomáticos (Mancianti et al, 1988). Esta mejor respuesta al tratamiento de los casos diagnosticados en fases tempranas, ha sido aprovechada por Gramiccia y col. (1988) para conseguir una reducción en la prevalencia e incidencia de la leishmaniosis canina, así como en el porcentaje de oligo y polisintomáticos, en la isla de Elba, tratando precozmente la enfermedad y eliminando los casos polisintomáticos (Gramiccia et al, 1988). En efecto, el tratamiento precoz de la enfermedad proporciona a Bergeaud (1988) tasas de curación serológica superiores al 23% (Bergeaud, 1988).

En nuestro estudio, los mayores porcentajes de remisión se alcanzan en aquellos animales diagnosticados en fase inicial, llegando al 100% cuando se aplica el antimonial por vía SC. Además, para todos los protocolos de tratamiento, el número de ciclos y, por tanto, la dosis total de Glucantime® administrada hasta alcanzar la remisión fue significativamente mayor para los perros diagnosticados en fase de estado que para los que iniciaron la terapia en fases iniciales (tablas R.III.B.8 y P.III.B.7). De igual modo, Thakur y col. (1988) observan que pacientes humanos con la enfermedad (kala-azar) establecida durante más tiempo tardan más en responder a la terapia y necesitan un tratamiento más largo para alcanzar la curación (Thakur et al, 1988). En esta línea, el laboratorio fabricante de Glucantime® contempla la administración de una dosis total diferente según el grado de afección clínica del animal (Vademecum de Veterinaria Garsi 92, 1992; Guía de Productos zoonosanitarios Veterindustria, 1994).

Nuestros resultados del estudio retrospectivo sugieren que en las fases iniciales de enfermedad, las remisiones se alcanzan con dosis bajas de Glucantime® (G2/G2+Z) aplicando un número de ciclos prácticamente igual al administrado con las pautas que emplean alrededor del doble de esta cantidad del antimonial (G1/G1+Z), lo que podría suponer, entre otras cosas, un importante ahorro económico. Sería interesante comprobar si administrando la mitad de inyecciones del protocolo G1/G1+Z, en perros diagnosticados en fases tempranas de la enfermedad, se consiguen los mismos efectos en cuyo caso, además de ahorrar en medicamento, se ganaría en tiempo.

Sin embargo, para conseguir la remisión en los animales en los que se instaura la terapia en fases de estado de la enfermedad, se necesita una dosis total de antimonio similar en todos los casos independientemente de que se administre en un mayor o menor número de inyecciones, dado que la relación entre el número de ciclos del protocolo G1/G1+Z y del protocolo G2/G2+Z es próxima a dos (tabla R.III.B.7), relación cercana a la existente entre las dosis empleadas por cada uno de estos protocolos.

Estos resultados, que apuntan hacia la necesidad de administrar **dosis totales equivalentes de Glucantime®** para obtener una misma respuesta, podrían explicar la gran variedad de protocolos de tratamiento (en dosis y duración) aplicados frente a esta enfermedad (Euzebý, 1988; Mendoza *et al*, 1983; Tassi, 1989; Tesouro *et al*, 1995c), puesto que la eficacia terapéutica podría ser similar aunque aplicando dosis más altas la respuesta a la terapia sería más rápida, como así lo sugieren algunos estudios realizados sobre personas afectadas de kala-azar. Particularmente Chulay (1983) y Zijilistra (1993) han podido constatar la misma evolución hacia la remisión (curación) de pacientes tratados bajo distintos protocolos pero con una dosis total igual; sin embargo, la reducción en la carga parasitaria fue más rápida en aquellos que recibieron las dosis diarias más altas (Chulay *et al*, 1983; Zijilistra *et al*, 1993).

Todas estas observaciones apoyarían las tendencias actuales que propugnan la aplicación de los antimoniales de forma ininterrumpida a intervalos de tiempo más cortos (cada 8-12 horas), administrándolos a dosis y por vías que aseguren una concentración suficiente y mantenida del fármaco en el organismo (Tassi, 1989; Tassi *et al*, 1994; Valladares *et al*, 1996; Ferrer, 1997b).

La **caracterización** realizada en el estudio prospectivo nos permitió descubrir qué variables (consideradas en el momento del diagnóstico) están relacionadas con el **número de ciclos** administrados hasta la remisión.

Entre las variables cuantitativas, distintas fracciones del proteinograma (proteínas totales, albúmina, γ -globulinas y cociente Alb/Glo) y del eritrograma presentaron unas correlaciones significativas con el número de ciclos. Por el contrario, el título de anticuerpos no muestra influencia significativa sobre los ciclos administrados hasta la remisión.

Las alteraciones iniciales observadas en el proteinograma han sido sugeridas como indicadoras de la posible duración del tratamiento y de hecho, al igual que en el presente trabajo, el perfil de proteinograma es utilizado ampliamente en el seguimiento del mismo (Groulade, 1988; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b).

El eritrograma, sin embargo, nunca ha sido considerado como un parámetro relevante en la evolución de la enfermedad. Tan sólo conocemos una cita según la cual la concentración de ferritina sérica, estrechamente relacionada con la serie roja, se muestra como un marcador pronóstico en el tratamiento de la leishmaniosis canina (Gascón *et al*, 1994).

El análisis estadístico tampoco selecciona el peso de los animales como un parámetro significativo en relación con los ciclos de tratamiento. La confirmación de este hallazgo mediante el test de χ^2 (tabla P.III.B.8), previa clasificación de los casos según peso, nos parece especialmente importante, ya que las dosis máximas administradas se limitaron a 4500 mg de antimonio de meglumine (3 ampollas de Glucantime®) por perro y día, lo cual supone que los perros por encima de 30 kg habrían recibido dosis proporcionalmente inferiores del antimonial que aquellos con un peso, en el momento del diagnóstico, igual o inferior a 30 kg.

Esta limitación en la dosis total diaria seguiría la línea de las recomendaciones de la OMS para el tratamiento en personas (OMS, 1990; Gradoni *et al*, 1995). Además, se justifica por la idea de que los fármacos deberían ser administrados en función de la superficie corporal en lugar de por el peso, lo que reduciría las diferencias de dosificación entre perros de distinto tamaño. De hecho, Tassi (1989) recomienda la administración de una dosis de 43 mg Sb⁵⁺/kg en perros de 20 kg o menos y de 28,35 mg Sb⁵⁺/kg en animales de más de 20 kg (Tassi, 1989). Por último, no hay que olvidar el aspecto económico, que podría actuar como un factor limitante a la hora de tratar animales de mucho peso (Ferrer, 1997b), particularmente en el caso de esta enfermedad en la que el medicamento aplicado es caro y los protocolos terapéuticos de larga duración.

La ausencia de diferencias significativas entre el número de ciclos de tratamiento administrado hasta la remisión y el peso permite integrar a todos estos perros en una población homogénea en cuanto a las dosis de fármaco recibidas y admitir como válida esta limitación en la posología a pesar de que en medicina humana publicaciones recientes lo desaconsejen (Herdwaldt *et Berman*, 1992a; Zijilistra *et al*, 1993).

Entre las variables cualitativas, además de la fase y el cuadro clínico, el número de ciclos se asocia significativamente al tipo de respuesta a corto plazo (tabla P.III.B.7). En todos los casos con respuesta muy favorable fue suficiente administrar un sólo ciclo de tratamiento, mientras que el promedio de ciclos que recibieron los casos con respuesta favorable fue prácticamente el doble. Esto sería análogo, como ya se ha comentando, a lo descrito por Thakur (1988) que observa pacientes que responden más rápidamente que otros, en relación con el tiempo que lleve la enfermedad establecida en los individuos y que, una buena parte de los que no responden inicialmente, llegan a curar tras la prolongación del tratamiento (Thakur *et al*, 1988).

Finalmente, dentro de este apartado, la **comparación** entre los valores medios de las variables cuantitativas en el **momento del diagnóstico** y en el **de remisión**, nos permite detectar cambios significativos en la práctica totalidad de los parámetros biopatológicos entre ambos momentos. Aquellos que se encontraban alterados inicialmente se normalizan, en especial y como es lógico los que se consideraron para definir la consecución de la remisión; pero incluso algunos parámetros biopatológicos que mostraban valores fisiológicos en el diagnóstico, sufren modificaciones significativas.

Estas oscilaciones, en principio carentes de interpretación patológica, serán más detalladamente analizadas y debatidas cuando discutamos la evolución de los distintos parámetros y la valoración predictiva de la respuesta terapéutica.

V- EVOLUCION DE LOS CASOS QUE REMITIERON

Un hecho admitido y ampliamente descrito en la bibliografía es que con los tratamientos actuales y más concretamente con el empleo de Glucantime® no se alcanza la curación definitiva (parasitológica) de la leishmaniosis canina, de manera que la mayor parte de los casos que evolucionan favorablemente y alcanzan la remisión terminan por presentar una recidiva del proceso en un plazo mayor o menor de tiempo (Lanotte *et al*, 1979; Rodríguez *et al*, 1984; Slappendel, 1988; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992), por lo que se hace necesario el control periódico de los animales (Groulade, 1988; Cairó *et Font*, 1991; Franc, 1993; Roze *et Pages*, 1994; Ferrer, 1997b).

En nuestro estudio estos controles se realizaron a intervalos de tiempo regulares, según la pauta descrita en el capítulo de materiales y métodos. Aun así, en ocasiones y atendiendo a nuestras recomendaciones, los propietarios adelantaron el momento de revisión cuando detectaron alguna anomalía en su perro. Según nuestra experiencia, estas anomalías suelen asemejarse a las primeras manifestaciones clínicas advertidas en la enfermedad o en anteriores recidivas.

Evidentemente, la constatación de la presentación de una recidiva depende del tiempo de seguimiento de los casos que, a su vez, está íntimamente ligado al interés y disposición de los propietarios. Por consiguiente, admitimos que en principio toda información sobre tasas de recidiva está subestimada ya que siempre se pierden casos cuyo porvenir, claro está, se desconoce.

A pesar de ser conscientes de esta limitación nos parece interesante abordar en profundidad la evolución a largo plazo de nuestros casos, tanto de los que presentaron recidiva como de los que permanecieron en remisión durante el tiempo que fueron controlados. Como se desprende de los resultados, la distribución de los tiempos de seguimiento de los animales que alcanzaron la remisión, clasificados según distintos criterios, puede considerarse homogénea, lo que permite la realización de comparaciones entre ellos.

V.A –. RECIDIVAS

En relación con los distintos criterios adoptados para definir la presentación de una recidiva los de nuestro estudio podrían ser considerados como exigentes, dado que no sólo se basan en la reaparición de manifestaciones clínicas (Slappendel, 1988; Lamothe, 1997a), sino que también contemplan las modificaciones en el proteinograma y en el título de anticuerpos. Estos dos parámetros son considerados por muchos autores indicadores sensibles para la detección de recidivas ya que sus perturbaciones preceden a la sintomatología (Giauffret *et al*, 1971; Dunan, 1978; Groulade, 1983; Euzeby, 1988; Rodríguez *et al*, 1984; Tesouro, 1992b; Roze *et Pages*, 1994; Tesouro *et al*, 1995c; Ferrer, 1997a).

La controversia acerca de la validez del título de anticuerpos para seguir la evolución de los animales tratados y detectar posibles recidivas, vendría suscitada por la diferente metodología empleada para la detección de los anticuerpos específicos frente a *Leishmania infantum*. Así, Ferrer y col. (1995) han podido comprobar cómo determinadas técnicas serológicas (particularmente Dot ELISA) no permiten realizar este seguimiento (Ferrer *et al*, 1995).

Por el contrario y aun admitiendo una cierta subjetividad en su lectura, la IFI se revela como una prueba con una buena repetitibilidad y reproductibilidad (Quilici *et al*, 1968; Giauffret *et al*, 1971; Lanotte *et al*, 1979). Así, una seroconversión significativa, es decir, un aumento de la titulación en dos o más diluciones, es un indicativo inequívoco de reactivación o reagudización del proceso (Giauffret *et al*, 1971; Dunan, 1976; Lanotte *et al*, 1979; Euzeby, 1988; Bergeaud, 1988; Franc, 1993; Bourdoiseau, 1993).

Las características de la IFI convierten a esta técnica serológica en un procedimiento altamente específico y sensible para el control de los pacientes tratados (Lanotte *et al*, 1979), especialmente si tenemos en cuenta las limitaciones del examen parasitológico tras un tratamiento efectivo (Slappendel, 1988; Cairó *et Font*, 1991; Kontos *et Koutinas*, 1993). Incluso los resultados obtenidos con la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), cuando son negativos, dejan dudas acerca de si el animal está realmente libre de parásitos, ya que se ha podido detectar la presencia de estos protozoos en perros aparentemente sanos, años después del tratamiento (Ferrer, 1997b).

Aunque las modificaciones del proteinograma preceden a la aparición de los signos clínicos y, por tanto, éste constituye un parámetro extraordinariamente útil en la detección de recidivas (Giauffret *et al*, 1976; Groulade, 1983; Cairó *et Font*, 1991; Tesouro, 1992b), tiene el inconveniente de no ser específico para esta enfermedad, observándose perturbaciones de sus fracciones en otras patologías (Giauffret *et al*, 1976; Schaer *et al*, 1985; Sainz *et al*, 1993; Tesouro *et al*, 1994) que deberían ser descartadas antes de atribuir tales alteraciones a una recidiva de la leishmaniosis. Esta escasa especificidad del proteinograma hace aconsejable contar con otro parámetro que, como el título de anticuerpos, confirme o descarte la presentación de una recidiva.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que estos animales pueden padecer otros procesos patológicos (Sánchez Botija, 1936; Cabassu, 1988a; Cairó *et Font*, 1991; Varela, 1992; Lamothe, 1997b), algunos de ellos con una sintomatología similar a la leishmaniosis, cuya presentación no ha de confundirse con una recidiva. En nuestra área geográfica la ehrlichiosis canina debe ser particularmente considerada, ya que presenta un buen número de alteraciones clínicas y biopatológicas en común con la leishmaniosis (Schaer *et al*, 1985; Sainz *et al*, 1993; Núñez-Torrón *et al*, 1996) y su prevalencia en la Comunidad de Madrid ha sido estimada en un $6.50 \pm 1.70\%$ (Sainz, 1996).

Ante una sospecha clínica de recidiva las posibles concurrencias deben ser descartadas o tratadas específicamente (Cairó *et Font*, 1991; Sainz, 1996), teniendo siempre presente que cualquier situación de estrés, incluidas dichas concurrencias, puede agudizar la leishmaniosis (Tesouro, 1984a).

En el estudio prospectivo se **caracterizó el suceso de recidiva** en función de las variables cualitativas y cuantitativas (parámetros biopatológicos), tanto en el momento del diagnóstico como en el de remisión (tabla P.IV.A.1.1).

Entre todas ellas, el número absoluto de **linfocitos** observado en los dos momentos es el que presenta un mayor nivel de significación. Además, en el momento del diagnóstico se encuentran relaciones significativas con el cociente Alb/Glo, con la concentración de β -globulinas y con el recuento de glóbulos blancos y de eosinófilos entre los animales que recidivaron y los que no, lo que permitiría pensar que al menos algunas de estas variables podrían actuar como factores predictivos de la presentación o no de recidiva (estos resultados serán comentados dentro del apartado de predicción).

Una vez estudiadas las **características de los animales que presentaron recidiva** nos pareció interesante investigar si, además del título de anticuerpos y el proteinograma (cuya alteración era indicativa de la presencia de recidiva), alguno de los otros parámetros biopatológicos sufría una modificación significativa entre el momento de la recidiva y el inmediatamente anterior. En este sentido, los valores de la serie roja muestran un ligero descenso en la recidiva con respecto al control anterior que llega a ser estadísticamente significativo en el caso del hematocrito (tabla P.IV.A.1.2), lo que sugiere que el eritrograma podría ser, aunque en menor medida, un indicador de la recidiva.

En nuestro estudio retrospectivo se comprueba cómo la presentación de recidiva es independiente del tratamiento empleado (en función de la dosis diaria de Glucantime®) para alcanzar la remisión ($G1/G1+Z$ versus $G2/G2+Z$) (tablas R.IV.A.1 y R.IV.A.5). Igualmente, el porcentaje de recidivas cuando se administra el Glucantime® por vía SC es semejante al obtenido tras la administración IM (P.IV.A.1). En este sentido, la **tasa global de recidiva** observada, considerando ambos estudios conjuntamente, es del 39.65% (46/116). En principio, esta tasa sería inferior a las recogidas en otras publicaciones en las que el fármaco específico empleado es igualmente el Glucantime®, a dosis totales similares a las nuestras o incluso mucho mayores (Slappendel, 1988; Bergeaud, 1988; Ferrer, 1992; Denerolle, 1996).

Utilizando un protocolo similar pero sin interrumpir el tratamiento Slappendel (1989) ve incrementada esta proporción (38/39) de recidiva y ni siquiera prolongando la administración del antimonial logra, al igual que Denerolle (1996), prevenir su aparición (Slappendel, 1989; Denerolle, 1996). Por otro lado, la tasa de recidiva obtenida a partir de una encuesta realizada entre clínicos de nuestra Comunidad (que refleja la aplicación de distintos fármacos específicos frente a la enfermedad y diversos protocolos terapéuticos) ha sido globalmente estimada en un 54% (Tesouro *et al*, 1995c).

Aunque el porcentaje global de recidiva es alrededor de dos veces superior en los perros diagnosticados en **fase de estado versus fase inicial**, en el análisis estadístico tanto en el estudio retrospectivo como en el prospectivo no llegaron a observarse unas diferencias suficientes que permitieran establecer una asociación clara (indiscutible), entre la fase y la presentación de recidiva. En ambos estudios, estas diferencias sólo pueden considerarse casi significativas (tablas R.IV.A.4 y P.IV.A.5).

Al estudiar la posible relación entre la presentación de recidiva y el tipo de respuesta a corto plazo post-tratamiento, observamos que tampoco nuestra colección de datos permite detectar diferencias significativas, a pesar de que el porcentaje de recidiva es algo inferior para el grupo de perros que presentaron una respuesta más rápida que para los que respondieron más lentamente:

TIPO DE RESPUESTA	RECIDIVA SI <i>n</i> %	RECIDIVA NO <i>n</i>	TOTAL REMISION <i>n</i>
MUY FAVORABLE	31 (37.80)	51	82
FAVORABLE + MANTENIMIENTO	15 (44.12)	19	34
TOTAL	46	70	116

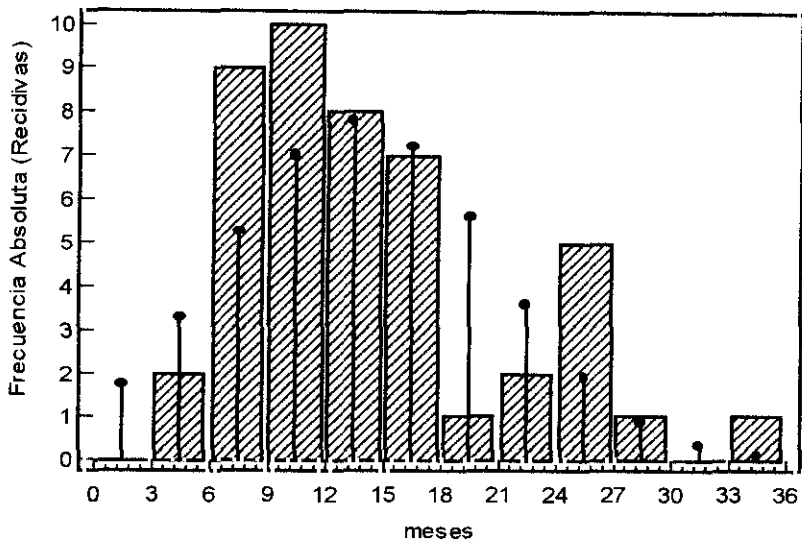
$\chi^2: 0.17992$ g.l.: 1 $p = 0.67144$

Distribución y comparación del tipo de evolución a largo plazo (recidiva sí o no) en función de la respuesta a corto plazo.

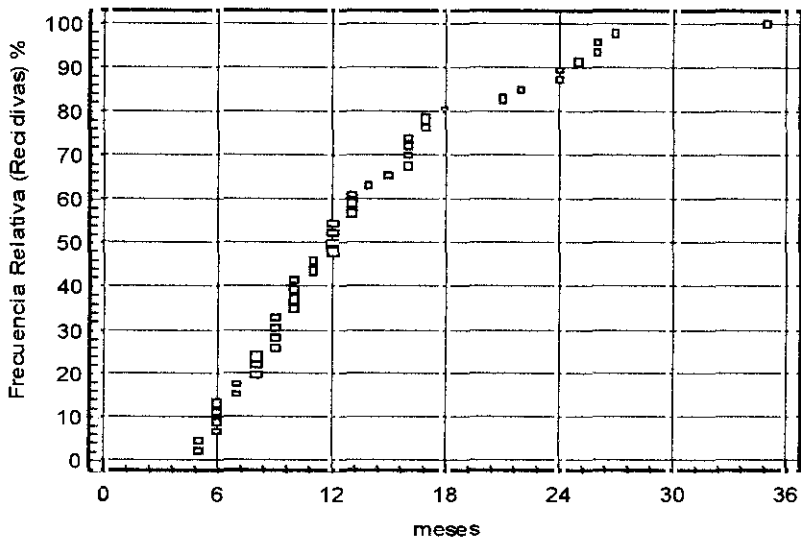
En lo que se refiere a los tiempos transcurridos (considerados desde la instauración de la terapia) hasta la presentación de la primera recidiva, la ausencia de diferencias significativas tanto en función de la terapia administrada (tablas R.IV.A.6 y P.IV.A.3) como de la fase de la enfermedad (tablas R.IV.A.7 y P.IV.A.6), nos permite valorar globalmente el **tiempo medio de presentación de recidiva** en un 13.74 meses. Además, la distribución en función del tiempo de todos estos casos que presentaron recidiva puede ajustarse a una curva normal, como a continuación presentamos:

	<i>m</i>	σ	S_m	mínimo	Máximo	<i>n</i>
T. RECIDIVA (meses)	13.7391	6.9998	1.0321	5	35	46
Diferencia máxima teórica:		0.1772 ($p < 0.1$)		0.1996 ($p < 0.05$)		
Diferencia máxima observada:		0.15074		(NO SIGNIFICATIVO)		
PERCENTILES		2.5% = 5.00		97.5% = 29.80		
		5% = 5.80		95% = 26.20		
		10% = 6.00		90% = 24.90		
		25% = 9.00		75% = 17.00		

Conformidad de la distribución del tiempo de recidiva con una curva de Gauss



Distribución de los casos en función del tiempo de presentación de recidiva (independientemente del tipo de tratamiento recibido).



Distribución acumulativa de los casos en función del tiempo de presentación de recidiva (independientemente del tipo de tratamiento recibido).

Si analizamos cómo se distribuye la frecuencia relativa acumulada de recidivas en función del tiempo, se aprecia claramente cómo en la inmensa mayoría (alrededor del 90%) de los casos que sufren recidiva, ésta se presenta **dentro de los 2 años de seguimiento**; habiéndose detectado aproximadamente la mitad de las recidivas durante los 12 primeros meses.

Estas observaciones coinciden con lo recogido en la bibliografía. Así, distintos autores han observado que con el empleo de Glucantime® como fármaco específico (100 mg/kg/día en ciclos de 15-30 inyecciones) la presentación de la recidiva se produce antes de los 12-18 meses tras la remisión (Giauffret *et al*, 1976; Slappendel, 1988; Catarsini, 1989; Cairó *et Font*, 1991). Particularmente Ferrer (1992) encuentra un 75% de recidivas en los 2 años siguientes al tratamiento, administrando antimonio de meglumine a la dosis de 100 mg/kg/día, en 2-3 ciclos de 15 días con intervalos de descanso de 10 días (Ferrer, 1992).

El hecho de que la mayoría de los casos que recidivan lo hagan entre los 6 y los 18 meses de seguimiento (en torno a un 70%), sugiere que los controles periódicos en los animales tratados deberían ser especialmente considerados durante este intervalo de tiempo.

Según las respuestas a la encuesta realizada entre los veterinarios de pequeños animales de la Comunidad de Madrid, las recidivas se presentarían en un periodo de 3 a 13 meses dependiendo de la fase de la enfermedad en que se diagnostique el caso. Así, los perros tratados en fases avanzadas recidivan en torno a los 3 meses, los casos en fases de estado lo harían en 7.5-9.3 meses y los que se encuentran en fases iniciales entre los 11 y los 14 meses post-tratamiento (Tesouro *et al*, 1995c).

Aunque, en principio, no llegamos a encontrar diferencias significativas en el tiempo de recidiva según la fase de la enfermedad, el estudio de supervivencia llevado a cabo con la muestra global y que abordaremos más adelante sí permite encontrar esta asociación cuando se consideran las tasas acumulativas de permanencia en remisión (libre de recidiva) en función del tiempo.

En los últimos años muchos autores han incluido el alopurinol en sus protocolos terapéuticos (Liste *et Gascón*, 1995; Vercamen *et De Deken*, 1995; Lester *et Kenyon*, 1996), generalmente asociado a otros fármacos específicos frente a la enfermedad (Tesouro *et al*, 1995c; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997b). Recientemente, además, Ginel y col. (1997) han puesto de manifiesto la capacidad de este análogo de las purinas para disminuir y retrasar la aparición de recidivas (Ginel *et al*, 1997).

En esta línea, Ferrer (1997a) ve reducida la tasa de recidiva (menos del 50%) en los dos años post-tratamiento asociando el Glucantime® (75 mg/kg/día en ciclos de 1 mes) a alopurinol (20 mg/kg/día durante un mínimo de 6 meses) (Ferrer, 1997a) con respecto al empleo del antimonial solo (Ferrer, 1992).

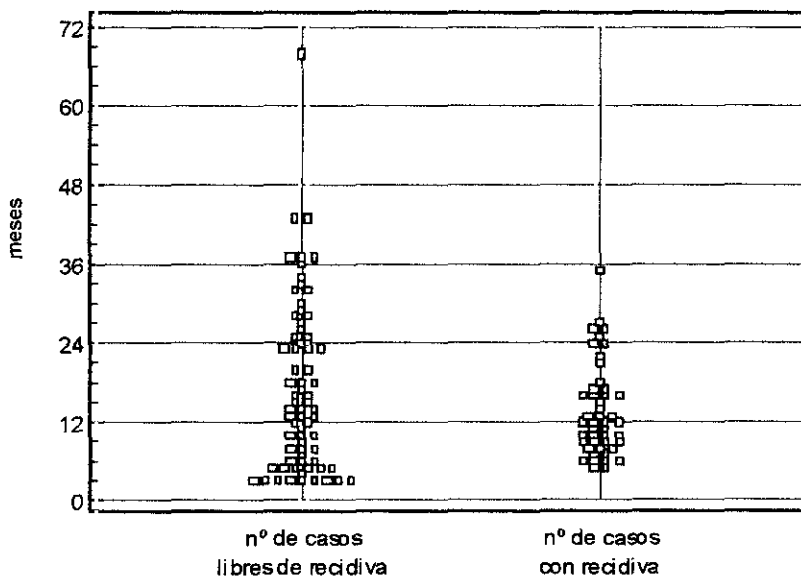
Los clínicos de nuestra comunidad también parecen retrasar sensiblemente la recidiva (alrededor del doble de tiempo) cuando aplican ambos fármacos conjuntamente (Tesouro *et al*, 1995c). Por el contrario, Ribera y col. (1996) no detectan este efecto profiláctico del alopurinol en pacientes VIH positivos con leishmaniosis (*L. infantum*) (Ribera *et al*, 1996). De la misma forma, en nuestro estudio este efecto tampoco ha podido ser constatado estadísticamente (tabla R.IV.A.9).

Insistimos en que el alopurinol sólo fue administrado hasta alcanzar la remisión y, según se desprende de la bibliografía, este efecto se conseguiría cuando su administración se prolonga durante largos periodos de tiempo o a intervalos regulares de forma permanente tras la remisión (Ginel *et al*, 1997; Ferrer, 1997a).

V.B -. PERIODOS DE REMISION

Aunque los intervalos de seguimiento en los perros que permanecen en remisión es variable, considerando los dos estudios conjuntamente, el **promedio** (17.2 meses) y la mediana (calculada en 14 meses) de este tiempo de seguimiento superan el promedio de tiempo de presentación de las recidivas observadas, lo que podría sugerir que la mayoría de éstas habrían sido detectadas de haberse producido.

Si analizamos con detalle la distribución de los tiempos de seguimiento de los animales que no recidivan comprobamos que si bien existe un importante número de casos que se pierden a lo largo del primer año (28 casos), la mitad de ellos superan los 14 meses de seguimiento y más de un 25% de los casos los dos años (incluso en un 10% de los perros el tiempo de supervisión sobrepasa el tiempo máximo observado de presentación de recidiva, es decir, los 35 meses) como se muestra en la siguiente figura:



Distribución de los casos que permanecen en remisión en función del tiempo de seguimiento y de los casos que recidivaron en función del tiempo de presentación de recidiva (independientemente del tipo de tratamiento recibido).

Pocos son los trabajos recogidos en la bibliografía que analizan **las tasas y los tiempos de permanencia en remisión** tras la instauración del tratamiento.

Algunos autores señalan el número o porcentaje de casos que no presentan recidivas en todo el tiempo de seguimiento de su estudio. Así, Catarsini (1989) estima la tasa de permanencia en remisión en un 25-30% de los perros seguidos durante 2-3 años o más (Catarsini, 1989). Lamothe (1997) administrando una dosis total de anfotericina B > 6mg/kg alcanza una proporción de permanencia en remisión de más del 95% durante el primer año de seguimiento (Lamothe, 1997a).

Otros autores describen el tiempo de supervivencia (en sentido estricto) de los animales tratados, pero no detallan el número de recidivas ni la frecuencia con que éstas aparecen y tampoco indican los tratamientos administrados durante este tiempo (Slappendel, 1988; Tesouro *et al*, 1995c).

Sin embargo y hasta lo que nosotros sabemos, no hay ningún trabajo sobre el tratamiento de leishmaniosis canina que realice un estudio de análisis de la supervivencia, teniendo en cuenta los datos incompletos (“censored data”), es decir, los casos perdidos.

Tanto en el estudio retrospectivo como en el prospectivo nos planteamos estudiar la función de supervivencia entendiendo esta como la permanencia en remisión, es decir, la no presentación de recidivas, tras dar por finalizado el tratamiento. Los intervalos de tiempo considerados al igual que para la recidiva vienen calculados desde el inicio de la terapia.

En nuestro primer estudio, al comparar por el método de Kaplan-Meier las curvas de supervivencia de los grupos que recibieron dosis altas y dosis bajas de Glucantime® se comprueba la ausencia de diferencias significativas entre las dos distribuciones (tabla R.IV.B.a).

Lo mismo ocurre cuando se comparan las curvas estimadas para los grupos tratados con dosis similares de antimonio de meglumine por vía SC *versus* IM (P.IV.B.a).

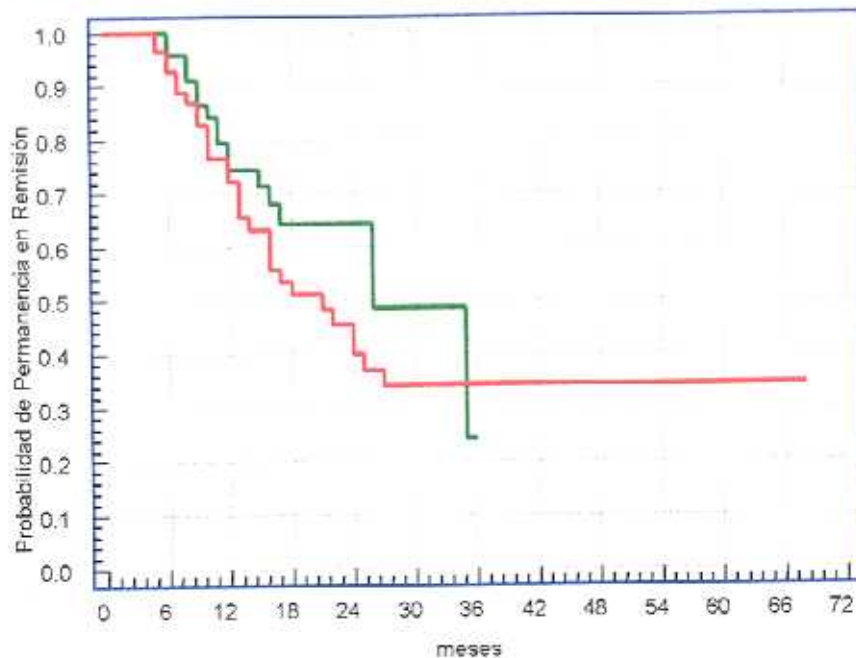
Esta paridad en los resultados de los dos estudios sugiere una distribución de supervivencia similar para ambos y, de hecho, el análisis recogido en la gráfica expuesta a continuación, nos permite confirmar que las tasas de recidiva (globales), en este caso representadas por su valor opuesto como tasas de permanencia en remisión, no presentan ninguna asociación con el tratamiento administrado y, es más, esta independencia se conserva incluso cuando se considera la variable aleatoria tiempo y se comparan las tasas acumulativas estimadas.

**Tasas de Supervivencia (Permanencia en Remisión)
Acumulativa (error estándar)**

MESES	GRUPO		MESES	GRUPO	
	G1+Z-SC	G1/G1+Z y G2/G2+Z		G1+Z-SC	G1/G1+Z y G2/G2+Z
3	-	-	22	-	0.456 (0.079)
4	-	-	23	-	-
5	-	0.966 (0.024)	24	-	0.399 (0.077)
6	0.957 (0.029)	0.928 (0.033)	25	-	0.371 (0.079)
7	-	0.889 (0.043)	26	0.484 (0.125)	-
8	0.912 (0.042)	0.870 (0.046)	27	-	0.342 (0.077)
9	0.866 (0.050)	0.828 (0.053)	28	-	-
10	0.843 (0.055)	0.766 (0.059)	29	-	-
11	0.795 (0.061)	-	30	-	-
12	0.745 (0.067)	0.722 (0.064)	32	-	-
13	-	0.655 (0.068)	33	-	-
14	-	0.631 (0.072)	34	-	-
15	0.714 (0.078)	-	35	0.242 (0.149)	-
16	0.682 (0.082)	0.558 (0.073)	36	-	-
17	0.646 (0.088)	0.534 (0.076)	37	-	-
18	-	0.510 (0.076)	43	-	-
20	-	-	68	-	-
21	-	0.485 (0.080)			

Test de Comparación de Curvas de Supervivencia

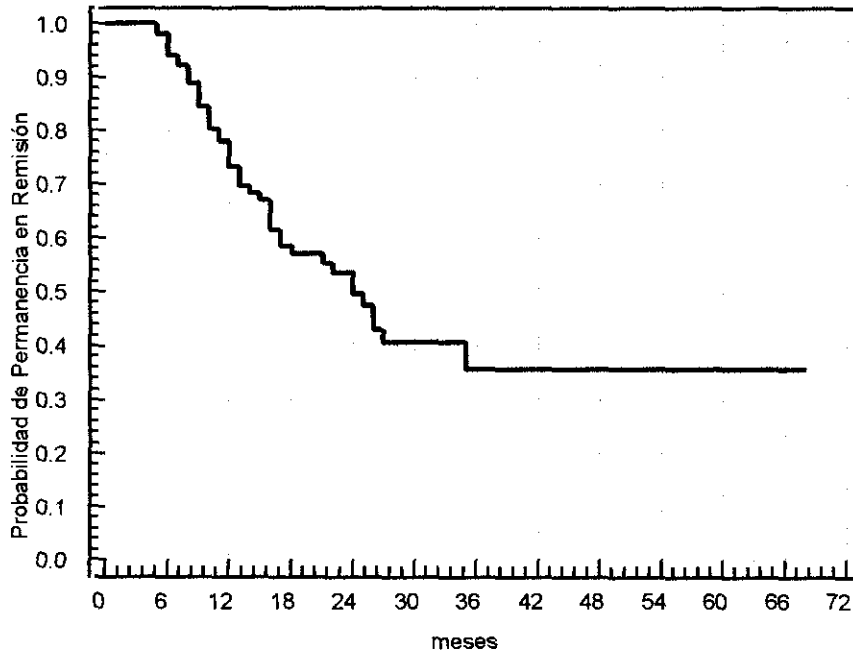
Mantel-Cox $p=0.2354$ Tarone-Ware $p=0.1965$ Breslow $p=0.2072$



Estudio de supervivencia (permanencia en remisión), en función del tratamiento: G1+Z-SC (línea verde) y G1/G1+Z y G2/G2+Z conjuntamente (línea roja).

La homogeneidad entre las curvas de supervivencia para los distintos protocolos de tratamiento nos permite considerar a todos los casos (que alcanzaron la remisión - $n=116$) como si se trataran de una única muestra y así calcular la **curva de supervivencia global**:

Tasas de Supervivencia (Permanencia en Remisión) Acumulativa (error estándar)					
MESES	GRUPOS G1+Z-SC, G1/G1+Z y G2/G2+Z		MESES	GRUPOS G1+Z-SC, G1/G1+Z y G2/G2+Z	
3	-	-	22	0.536	(0.065)
4	-	-	23	-	-
5	0.981	(0.013)	24	0.496	(0.068)
6	0.941	(0.023)	25	0.475	(0.070)
7	0.920	(0.027)	26	0.430	(0.071)
8	0.889	(0.032)	27	0.406	(0.074)
9	0.846	(0.037)	28	-	-
10	0.802	(0.041)	29	-	-
11	0.779	(0.044)	30	-	-
12	0.732	(0.046)	32	-	-
13	0.696	(0.049)	33	-	-
14	0.684	(0.052)	34	-	-
15	0.670	(0.054)	35	0.355	(0.101)
16	0.614	(0.055)	36	-	-
17	0.585	(0.058)	37	-	-
18	0.570	(0.060)	43	-	-
20	-	-	68	-	-
21	0.553	(0.064)			



Estudio de supervivencia (permanencia en remisión) para los tres tratamientos (G1/G1+Z, G2/G2+Z y G1+Z-SC) conjuntamente.

El estudio conjunto de los tres tratamientos permite valorar la **tasa acumulativa libre de recidiva**, al año y a los dos años de seguimiento, en un 73.2% y un 49.6%, respectivamente. Además, comprobamos que al menos un porcentaje considerable de casos, en torno a un 35%, no van a presentar recidiva dentro de los 3 primeros años de seguimiento, tasa que se mantiene constante hasta casi 5 años. Esto significa que ninguno de los casos que supera los tres años de permanencia en remisión va a presentar recidiva en los dos años siguientes. Podría, entonces, admitirse que los animales que permanecen en remisión durante tanto tiempo están clínicamente curados.

Sería interesante comprobar si los perros que superan los tres años de supervisión en un estado de curación clínica, se acompañan del blanqueo parasitológico, aunque evidentemente esto resultaría muy difícil de confirmar.

Alvar y col. (1994) señalan que tras la administración de un tratamiento algunos animales recobran la capacidad de infectar a los flebotomos, incluso cuando éstos permanecen asintomáticos, corroborándose la imposibilidad de lograr la curación parasitológica en todos estos casos (Alvar *et al*, 1994). Hay que tener presente, sin embargo, que en este estudio el protocolo de tratamiento empleado se limitó a 20 días y, si bien los animales mejoraron clínicamente, no todos ellos alcanzaron los criterios de remisión exigidos en este estudio.

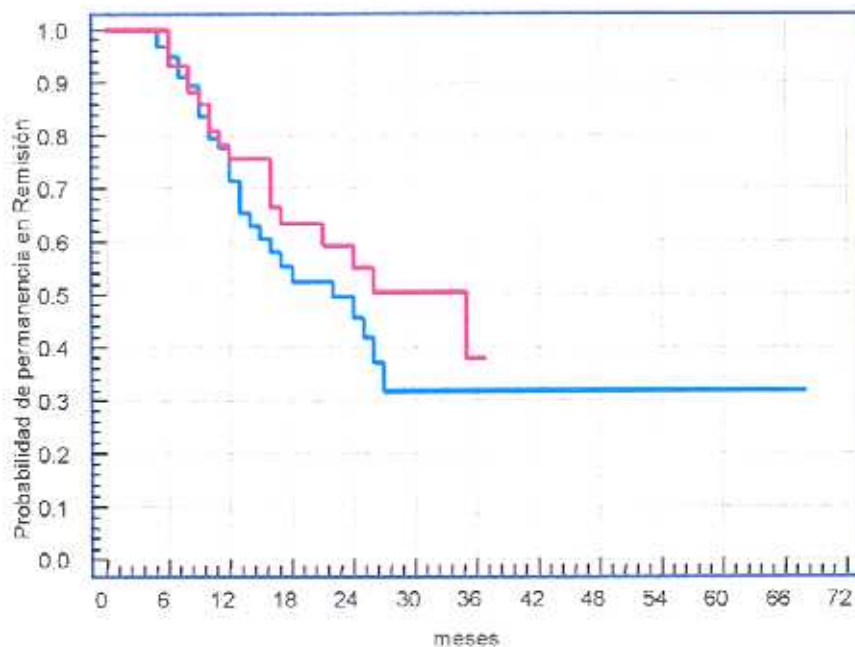
En nuestra opinión habría que precisar las características inmunitarias de los casos que tras una respuesta favorable al tratamiento presentan recidivas y de los que no recidivan, así como de los animales que mantienen la capacidad infectante y de los que no, ya que estas características inmunitarias podrían ser la clave. En este sentido, se ha constatado que algunos animales introducidos en un foco endémico y, por lo tanto, expuestos a la infección natural e incluso perros experimentalmente infectados con *L. infantum* no desarrollan la enfermedad (Berenger, 1988; Vidor *et al*, 1991; Killick-Kendrick *et al*, 1994; Pinelli *et al*, 1994a).

Como se recoge en la bibliografía, el padecimiento o no del proceso estaría íntimamente relacionado con la respuesta inmunitaria de cada individuo (Pearson *et al*, 1983; Killick-Kendrick *et al*, 1994; Pinelli *et al*, 1994a; Pal *et al*, 1995). ¿Sería posible que estos casos que no desarrollan recidivas hubieran alcanzado un *status* inmunitario similar al de los perros que se muestran resistentes a la infección?

El análisis de supervivencia, para toda la muestra que alcanzó la remisión, lo completamos considerando algunas variables nominales tales como el sexo, la edad y la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico. La **comparación de las curvas de permanencia en remisión** estimadas por el método de Kaplan-Meier permite aceptar la ausencia de relación del **sexo** y de la **edad** con la distribución en el tiempo de las tasas de permanencia de remisión (y, por tanto, con las tasas de recidiva):

Tasas de Supervivencia (Permanencia en Remisión) Acumulativa (error estándar)					
MESES	GRUPOS G1+Z, G2, G1+G1-Z y G2+G2-Z		MESES	GRUPOS G1+Z, G2, G1+G1-Z y G2+G2-Z	
	MACHOS	HEMBRAS		MACHOS	HEMBRAS
3	-	-	22	0.495 (0.085)	-
4	-	-	23	-	-
5	0.968 (0.022)	-	24	0.455 (0.093)	0.549 (0.099)
6	0.950 (0.029)	0.932 (0.037)	25	0.417 (0.092)	-
7	0.913 (0.038)	-	26	0.371 (0.098)	0.504 (0.102)
8	0.894 (0.042)	0.884 (0.048)	27	0.318 (0.099)	-
9	0.836 (0.050)	0.859 (0.054)	28	-	-
10	0.797 (0.055)	0.809 (0.061)	29	-	-
11	0.777 (0.058)	0.782 (0.067)	30	-	-
12	0.716 (0.062)	0.755 (0.069)	32	-	-
13	0.652 (0.066)	-	33	-	-
14	0.629 (0.072)	-	34	-	-
15	0.604 (0.076)	-	35	-	0.378 (0.149)
16	0.578 (0.078)	0.664 (0.077)	36	-	-
17	0.551 (0.079)	0.631 (0.086)	37	-	-
18	0.523 (0.081)	-	41	-	-
20	-	-	68	-	-
21	-	0.592 (0.095)			

Test de Comparación de Curvas de Supervivencia		
Mantel-Cox	$p=0.2863$	Tarone-Ware $p=0.3151$
		Breslow $p=0.3739$

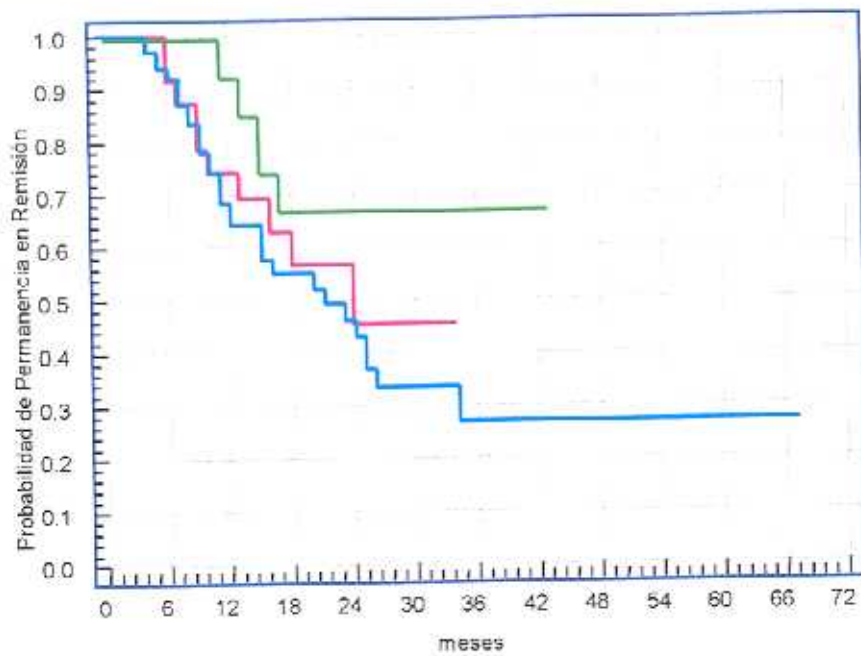


Estudio de supervivencia (permanencia en remisión) en función del sexo: Machos (línea azul) y Hembras (línea roja).

Tasas de Supervivencia (Permanencia en Remisión) Acumulativa (error estándar)							
MESES	GRUPOS G1+Z-S*, G2/G1+Z y G2/G2+Z			MESES	GRUPOS G1+Z-S*, G2/G1+Z y G2/G2+Z		
	JOVENES	ADULTOS	VIEJOS		JOVENES	ADULTOS	VIEJOS
3	-	-	-	22	-	0.491 (0.083)	-
4	-	-	-	23	-	-	-
5	-	0.970 (0.021)	-	24	0.453 (0.150)	0.460 (0.085)	-
6	0.917 (0.054)	0.937 (0.030)	-	25	-	0.429 (0.034)	-
7	0.873 (0.068)	0.921 (0.035)	-	26	-	0.368 (0.078)	-
8	-	0.869 (0.043)	-	27	-	0.335 (0.082)	-
9	0.786 (0.081)	0.833 (0.049)	-	28	-	-	-
10	0.742 (0.089)	0.779 (0.054)	-	29	-	-	-
11	-	0.741 (0.059)	-	30	-	-	-
12	-	0.682 (0.062)	0.923 (0.071)	32	-	-	-
13	0.693 (0.099)	0.642 (0.066)	-	33	-	-	-
14	-	-	0.839 (0.101)	34	-	-	-
15	-	-	0.775 (0.118)	35	-	0.268 (0.107)	-
16	0.630 (0.116)	0.573 (0.071)	-	36	-	-	-
17	-	0.549 (0.077)	0.671 (0.128)	37	-	-	-
18	0.567 (0.118)	-	-	43	-	-	-
20	-	-	-	68	-	-	-
21	-	0.520 (0.083)	-				

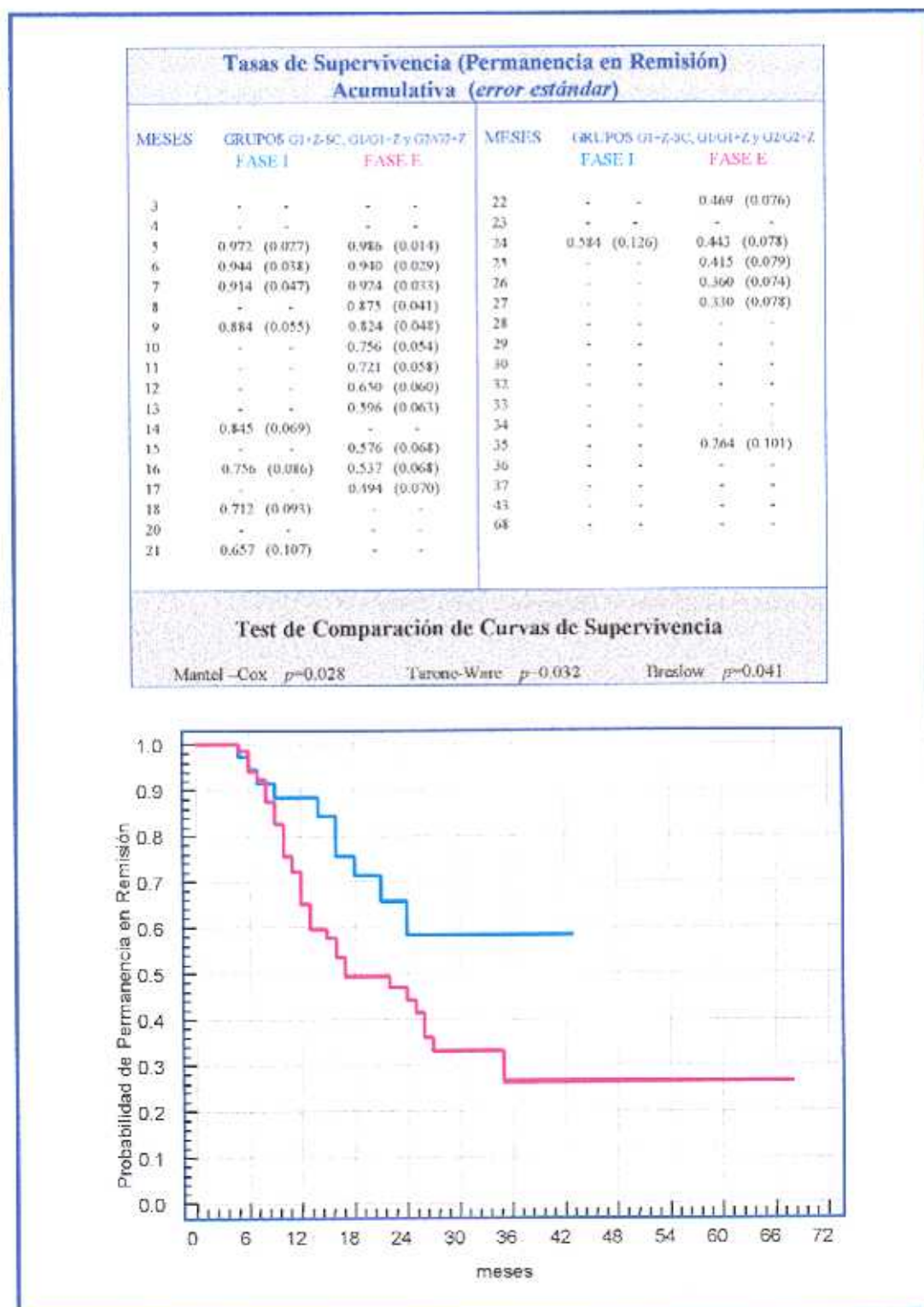
Test de Comparación de Curvas de Supervivencia

Mantel-Cox $p=0.1857$ Tarone-Ware $p=0.2119$ Breslow $p=0.2219$



Estudio de supervivencia (permanencia en remisión) en función de la edad: Jóvenes (línea /), Adultos (línea /) y Viejos (línea /).

Sin embargo, cuando consideramos la **fase de la enfermedad** en que se hallaban los casos en el momento del diagnóstico, las tres pruebas estadísticas aplicadas sí reflejan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la distribución de las tasas acumulativas de la serie en fase inicial y en fase de estado, resultados que se exponen a continuación:



Estudio de supervivencia (permanencia en remisión) en función de la fase de la enfermedad: Fase Inicial (línea azul) y Fase de Estado (línea roja).

Según nuestros resultados, comprobamos cómo la tasa estimada de permanencia en remisión supera el 58% en los casos tratados en fase inicial a los dos años de seguimiento, tiempo a partir del cual no se observa ninguna recidiva en este grupo de animales. Por el contrario, en los animales diagnosticados en fase de estado la tasa estimada de permanencia en remisión para los dos años cae por debajo del 45%, pudiéndose detectar posteriormente recidivas, disminuyendo la tasa estimada de permanencia en remisión hasta valores por debajo del 30% a partir de los tres años de seguimiento.

Es importante destacar que el análisis de supervivencia, al comparar las distribuciones de las tasas acumuladas de permanencia en remisión considerando las muestras globalmente, consigue establecer una diferencia significativa según la fase de la enfermedad, diferencia que se mostró como casí significativa cuando se compararon los porcentajes de remisión (o de su inversa, recidiva) de las distintas muestras por separado.

Estas observaciones rechazan la práctica llevada a cabo por ciertos autores de no tratar la enfermedad en los asintomáticos (Roze *et al*, 1994) y apoyan la idea, sostenida por otros, de que **los animales deben ser tratados en fases iniciales de la enfermedad** y periodos de incubación (Mancianti *et al*, 1986; Gradoni *et al*, 1988), no sólo por las razones sanitarias clásicamente esgrimidas, sino también porque la eficacia terapéutica es mejor (Berenger, 1988; Tesouro *et al*, 1992a; Alvar *et al*, 1994) e, incluso, la permanencia libre de recidiva va a ser mayor (Mancianti *et al*, 1988; Tesouro *et al*, 1995c) que en los animales sometidos a terapia en fases más evolucionadas (Bergeaud, 1988; Tesouro *et al*, 1995c).

V.C -. EVOLUCION DE LOS CASOS QUE PRESENTAN RECIDIVA

Como se comentó al exponer los resultados de este apartado en los estudios retrospectivo y prospectivo el reducido tamaño de las muestras, la heterogeneidad en las medidas adoptadas en los casos que presentaron una recidiva y las diferencias en los tiempos de supervisión hicieron necesario describir la evolución de, prácticamente, cada uno de ellos por separado. Por ello, resulta difícil hacer deducciones acerca de la evolución de estos casos. No obstante, queremos destacar y discutir algunos de estos resultados.

En primer lugar, nuestros datos estarían de acuerdo con las observaciones de algunos autores que mantienen que, tras la recidiva, la **duración del tratamiento** para conseguir una nueva remisión sería menor (Groulade, 1983; Cairó *et al*, 1991). Efectivamente, en nuestro estudio retrospectivo la serie de perros que presentan una primera recidiva y son sometidos a un nuevo tratamiento muestran mejores **respuestas a corto plazo** y **tasas de remisión** (2ª remisión) más altas que las obtenidas tras el momento del diagnóstico (tabla R.IV.C.3). Estas cifras podrían considerarse similares a las obtenidas con los perros diagnosticados en fase inicial tras el primer tratamiento (tabla R.IV.C.4), lo que parece lógico ya que el control periódico de los animales permite detectar las recidivas precozmente. Giauffret y col. (1976), Rodríguez y col. (1984) y Bergeaud (1988) (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Bergeaud, 1988) sostienen que, además, con tratamiento las recidivas serían cada vez menos graves y más espaciadas.

Por el contrario, otros autores han observado peores respuestas o una menor efectividad de la terapia tras la recidiva, tanto en medicina veterinaria (Lanotte *et al*, 1979; Denerolle, 1996) como en medicina humana (Brycesson *et al*, 1985a), que podría ser consecuencia de la selección de clones resistentes tras la estiboterapia (Grogl *et al*, 1988; Gramiccia *et al*, 1992; Alvar *et al*, 1995).

En nuestro trabajo, aunque las tasas de segunda recidiva son mayores y los tiempos de presentación de las mismas algo más cortos no llegan a mostrar diferencias significativas con los observados para las primeras recidivas. Teniendo en cuenta el reducido número de casos sería preciso realizar nuevos estudios para confirmar o descartar esta posibilidad.

Otro hecho que creemos de interés es la observación de una **evolución espontánea favorable** en dos casos de nuestro estudio prospectivo, en concreto en dos hembras gestantes, tras la primera recidiva. Aunque no hay evidencias de un efecto teratogénico por parte del Glucantime® (Leonard *et Gerber*, 1996) no se instauró tratamiento alguno en estas dos perras tras la detección de dicha recidiva.

Ciertos autores han puesto de manifiesto la influencia de la gestación en la aparición de la recidiva (Cairó *et al*, 1991; Varela, 1992). Los cambios en las concentraciones de las hormonas sexuales podrían tener cierto peso tanto en la aparición de la recidiva como en la posterior recuperación espontánea. La posibilidad de esta influencia hormonal ha sido apuntada por Brabin y Brabin (1993) en un amplio trabajo de revisión acerca de distintas enfermedades parasitarias. Las hembras podrían tener una respuesta mediada por células más activa que los machos. Esta ventaja se vería modificada durante la gestación en la que, para evitar el rechazo de los tejidos del feto, los aumentos en los niveles de estrógenos y progesterona actuarían para deprimir la respuesta celular. Se ha sugerido que niveles bajos de hormonas como estrógenos, progesterona, LH, ACTH y prolactina podrían estimular la actividad mononuclear, pero concentraciones elevadas de las mismas la deprimirían. Además, se han documentado casos de mujeres que habiendo enfermado de kala-azar durante el embarazo, se recuperan espontáneamente tras el parto (Brabin *et Brabin*, 1992). En cualquier caso hay que precisar que la infección durante la gestación no conduce necesariamente a una enfermedad severa (Varela, 1992; Brabin *et Brabin*, 1992).

Pensamos que si bien la evolución natural y espontánea en la mayoría de los animales que presentan una recidiva es hacia la agudización y agravamiento del proceso, al igual que han sido mencionadas ciertas remisiones o curaciones espontáneas (Sánchez Botija, 1936; Lanotte *et al*, 1979; Abranches *et al*, 1991b; Tesouro *et al*, 1992b; Cabral *et al*, 1992; Killick-Kendrick *et al*, 1994), esta posibilidad de recuperación tras la recidiva (consecuente a situaciones de estrés, etc. (Tesouro, 1994a)) podría darse en algunos casos.

Como nosotros, la bibliografía describe la presencia de cachorros muertos e, incluso, de abortos y momificación de fetos entre las camadas de las perras afectadas de la enfermedad (Varela, 1992). En lo que se refiere a los cachorros vivos, el seguimiento de algunos de ellos dio como resultado la obtención de títulos de anticuerpos (IFI) específicos negativos, coincidiendo con Berenger (1988) (Berenger, 1988). A pesar de ello, hay que tener en cuenta que recientemente se ha detectado la presencia de parásitos en un cachorro de pocos días de edad (Mancianti *et Sozzi*, 1995b) y que, en medicina humana, a menudo los neonatos no se diagnostican de kala-azar hasta muchos meses después del nacimiento, por lo que la transmisión congénita podría estar infravalorada (Brabin *et Brabin*, 1992).

Por último, dentro de este apartado, también parece interesante comentar la evolución de una perra que, a pesar de hallarse en fase inicial en el momento del diagnóstico y de la buena respuesta obtenida con el primer tratamiento (con el que se consiguió la remisión tras un solo ciclo), presentó una recidiva a los pocos meses. Como señalamos en el capítulo de resultados (pág. 177), los numerosos ciclos de tratamiento aplicados a este paciente tras esta primera recidiva no permitieron más que algunas mejorías que se precipitaban hacia **recaídas cada vez más graves**.

Esta evolución tan anómala (al menos en nuestra experiencia) podría estar relacionada con distintos factores. Por un lado, de acuerdo con las sugerencias de Gramiccia y col. (1992), sería posible que la resistencia se hubiera creado en el primer tratamiento (Gramiccia *et al*, 1992), aunque hay que tener en cuenta que la aplicación de los ciclos tras la primera recidiva fue muy irregular, lo que podría haber contribuido a la creación de clones resistentes (Grogel *et al*, 1989). La coincidencia de algunas de estas recaídas con la aparición del celo hacen sospechar de una de la enfermedad relación entre los cambios hormonales y la mayor susceptibilidad a la reagudización del proceso, debido a las modificaciones en la respuesta inmunitaria (previamente comentadas) que podrían darse en tales situaciones. Las pruebas de proliferación linfocitaria realizadas en el Departamento de Patología Animal I de nuestra Facultad a partir de muestras de sangre de esta perra fueron siempre negativas lo que pone de manifiesto una pobre respuesta celular, que podría haber sido determinante en la mala evolución de este caso (Iwobi *et al*, 1991; Nabors *et Farrel*, 1996; Piarroux *et al*, 1996).

VI - EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOPATOLOGICOS

Como se recoge en la revisión bibliográfica, el título de anticuerpos y el proteinograma son dos de los parámetros biopatológicos más relevantes en la valoración de la respuesta terapéutica y en la decisión de cesar y reiniciar la terapia (Giauffret *et al*, 1976; Lanotte *et al*, 1979; Rodríguez *et al*, 1984; Groulade, 1988; Berenger, 1988; Euzeby, 1988; Tesouro *et al*, 1992b; Roze *et Pages*, 1994; Ferrer, 1997b). -----

Por esta razón quisimos estudiar con detalle la evolución tanto del título de anticuerpos como del cociente Alb/Glo en los perros que alcanzaron y mantuvieron la remisión, estableciéndose un tiempo máximo de seguimiento de un año.

De acuerdo con nuestros objetivos nos proponíamos obtener las curvas que determinaran la dinámica de ambos parámetros para poder calcular sus ecuaciones. A partir de las mismas, conociendo el título de anticuerpos y el cociente Alb/Glo inicial, se podría estimar la cinética esperada de estos dos parámetros en el caso de una respuesta favorable (con los distintos protocolos de tratamiento aplicados) y, de esta forma, valorar la evolución observada en futuros casos clínicos.

VIA -. EVOLUCION DEL TITULO DE ANTICUERPOS

Al revisar nuestros resultados destacamos, en primer lugar, cómo la dinámica del título de anticuerpos muestra un **descenso significativo** en todos los grupos terapéuticos que alcanzaron la remisión, lo que contribuye a ratificar que la caída de las tasas de anticuerpos es un buen indicador de una respuesta efectiva a la terapia (Giauffret *et Tallercio*, 1971; Dunan, 1978; Reitter *et al*, 1985; Euzeby, 1988; Franc, 1993; Poli *et al*, 1997).

Como ha sido apuntado en los resultados, en algunos casos, tras la instauración del tratamiento y previamente a este descenso, se observa una **ligera elevación del título de anticuerpos** (en una o dos diluciones). Esta elevación transitoria, también descrita por distintos autores, se considera una respuesta inmunitaria exacerbada debida a la eliminación masiva de antígeno tras la destrucción de los parásitos inmediatamente después de iniciar la terapia (Pospischil *et al*, 1987; Pal *et al*, 1995) y pensamos que podría haber sido detectada en muchos más casos si los controles serológicos se hubieran hecho de forma menos espaciada en el tiempo. No obstante, Dunan (1978) comprueba que este pico de anticuerpos está ausente en un buen número de animales, especialmente en aquéllos con títulos iniciales muy elevados (Dunan, 1978).

Coincidiendo con otros trabajos (Giauffret *et Tallercio*, 1971; Dunan, 1978) nuestro estudio detallado sobre la evolución de los títulos de anticuerpos revela la presencia de **dos periodos de descenso** progresivo, uno más pronunciado y otro de caída lenta hasta alcanzar, en algunos casos, títulos considerados como negativos ($\leq 1/50$). Este tipo de evolución es particularmente evidente en los casos que reciben **dosis altas de Glucantime®** (IM o SC), en los que la dinámica del título de anticuerpos se ajusta a una ecuación logarítmica. En los perros tratados con dosis menores (G2/G2+Z) estos dos periodos de descenso no son tan evidentes y, de hecho, la ecuación lineal es la que se ajusta con un mayor grado de correlación en este grupo de animales.

Al analizar las historias clínicas de los perros que alcanzaron la remisión, comprobamos que el título de anticuerpos llegó a descender por debajo del umbral de positividad (dentro del primer año de seguimiento e independientemente del protocolo terapéutico empleado) en un número nada despreciable de casos, como se aprecia en la tabla expuesta a continuación:

TRATAMIENTO	TITULO $\leq 1/50$ <i>n</i>	TITULO $\leq 1/50$ %	TOTAL REMISION <i>n</i>
G2/G2+Z-IM	7	35	20
G1/G1+Z-IM	14	29.17	48
G1/G1+Z-SC	15	31.25	48
TOTAL	36	31.03 ± 4.29	116

$\chi^2: 0.226$

g.l.: 2

$p = 0.8937$

Distribución de los casos (frecuencias absolutas y relativas) en los que el título descendió por debajo del umbral de positividad en función del tratamiento recibido.

Estas **curaciones serológicas** se obtienen con una frecuencia significativamente superior en los perros que parten con títulos bajos ($\leq 1/800$), característica de nuestro grupo de animales asintomáticos y en fases iniciales, que en aquéllos en fase de estado de la enfermedad, como se demuestra en la tabla siguiente (en este estudio estadístico no se tuvo en cuenta la fase avanzada ya que de los 4 perros que remitieron en ninguno de ellos el título llegó a descender por debajo del umbral de positividad):

TRATAMIENTO	TITULO $\leq 1/50$ <i>n</i>	TITULO $\leq 1/50$ <i>% ± s_p</i>	TOTAL REMISION <i>n</i>
FASE I	24	58.54	41
FASE E	12	16.90	71
FASE A	0	0	4
TOTAL	36	31.03 ± 4.29	116

$\chi^2: 18.792$ g.l.: 1 $p = 1.458E-05$

Distribución de los casos (frecuencias absolutas y relativas) en los que el título descendió por debajo del umbral de positividad en función de la fase de la enfermedad.

Estos resultados apoyan una vez más la práctica de tratar los casos en fases tempranas de la enfermedad (Gradoni *et al*, 1988; Berenger, 1988). Si bien el hecho de haber alcanzado una serología negativa no excluye, según nuestros resultados, la posibilidad de una futura recidiva (¿reinfección?) (7 casos), la mayor parte de estos animales (29 casos) se mantienen en remisión y la tasa de anticuerpos no supera el umbral de positividad durante todo el tiempo de seguimiento, que es variable y que recogemos en la siguiente tabla:

TRATAMIENTO	< 12 MESES	12 -24 MESES	> 24 MESES
NUMERO DE CASOS	10	10	9

Distribución de los casos libres de recidiva en los que el título descendió y se mantuvo por debajo del umbral de positividad en función del tiempo de seguimiento.

En resumen, la proporción de animales que llegan a alcanzar títulos considerados como negativos durante el primer año de seguimiento, con respecto a la muestra global de los casos que remiten, es del 31.03%, tasa que concuerda con las obtenidas por Berenger (1988) (23%) y Denerolle (1996) (32%) aplicando tratamientos a base de Glucantime® mucho más prolongados que los nuestros (Berenger, 1988; Denerolle, 1996) y que discrepa de las publicaciones en las que se mantiene que los títulos rara vez se negativizan (Giauffret *et al*, 1976; Euzéby, 1988; Roze *et Pages*, 1994) o en las que las tasas de negativización serológica son netamente inferiores, como la señalada por Bergeaud (1988) en perros tratados en fases evolucionadas de la enfermedad (18.6%) (Bergeaud, 1988) o con la obtenida (paradójicamente) por Denerolle (1996) cuando asocia al tratamiento antimonial la administración indefinida de alopurinol (7.8%) (Denerolle, 1996).

VI.B -. EVOLUCION COCIENTE ALBUMINA/GLOBULINAS

Como ha sido comentado, la presencia constante de alteraciones en las proteínas plasmáticas en el curso de la leishmaniosis canina y su normalización en el caso de una respuesta favorable a la terapia, hacen del proteinograma un parámetro esencial a la hora de realizar el seguimiento de los casos (Giauffret *et al*, 1976; Rodríguez *et al*, 1984; Groulade, 1988; Martínez *et Lloret*, 1992; Carrera *et al*, 1996; Denerolle, 1996; Ferrer, 1997ba). De hecho, en perros experimentalmente infectados, se ha observado que dichas alteraciones comienzan a restablecerse a los pocos días de iniciar la terapia (Vitu *et al*, 1973) y su normalización se consigue dentro de los 3 meses post-tratamiento (Vitu *et al*, 1973; Reiter *et al*, 1985). Entre los valores que proporciona el proteinograma, probablemente el cociente Alb/Glo es el parámetro más representativo para el estudio de la evolución de las proteínas plasmáticas, ya que no existe un trazado electroforético típico de la leishmaniosis canina (Vitu *et al*, 1973; Giauffret *et al*, 1976).

Nuestros resultados reflejan que el proteinograma tiende a normalizarse tras un tratamiento efectivo con una mejoría muy evidente durante el primer trimestre, si bien la **rapidez con que se logra dicha normalización va a depender del cociente Alb/Glo inicial**, íntimamente relacionado con el grado de afección (fase de la enfermedad) del paciente en el momento de instauración de la terapia. Así, cuanto más bajos fueron estos valores iniciales mayor fue el tiempo necesario para conseguir su normalización.

El análisis estadístico demuestra que en los grupos de nuestro estudio (considerando cada protocolo de tratamiento por separado) la evolución del cociente Alb/Glo se ajusta, con unos coeficientes de correlación altamente significativos, a una curva de tipo potencial. No obstante, en alguno de los grupos sometidos al tratamiento G2/G2+Z la dinámica del cociente Alb/Glo se ajusta más significativamente a una recta (tabla R.V.B.2 y figuras R.V.B.a y R.V.B.b).

Esto sugiere que el grado de respuesta terapéutica mantiene una estrecha relación con el tipo de **tratamiento administrado**, de manera que los perros tratados con dosis más altas de Glucantime® (tanto por vía SC como IM) recuperan el perfil normal de las proteínas plasmáticas antes que aquellos sometidos a dosis más bajas del antimonial. Esto es particularmente cierto cuando el cociente inicial es inferior a 0.4, ya que por encima de este valor, la evolución del cociente se ajusta a un único tipo de curva (potencial), independientemente del tratamiento administrado (pág. 133).

Estas observaciones apoyarían la teoría (expuesta al discutir el número de ciclos administrados hasta alcanzar la remisión) de que los perros en fases de estado, que entre otras características presentan una marcada disproteinemia ($m \text{ Alb/Glo} = 0.39 \pm 0.2$), precisan dosis totales equivalentes de Glucantime® para llegar a la remisión, retrasándose la normalización del proteinograma cuando las dosis diarias son más bajas. Igualmente, estas observaciones reforzarían la hipótesis de que quizás en los animales diagnosticados en fases iniciales, en los que los valores del cociente son más altos ($m \text{ Alb/Glo} = 0.85 \pm 0.16$), sería suficiente la administración de una cantidad total de antimonio equivalente a un ciclo de G2/G2+Z para alcanzar la remisión, ya que la normalización del proteinograma se produce de la misma forma y en el mismo tiempo que cuando se administran dosis diarias más elevadas del antimonial.

Al igual que con el título de anticuerpos, a partir de las ecuaciones de regresión calculadas en nuestro estudio podemos estimar cómo se desarrolla la evolución favorable de uno de los principales parámetros biopatológicos (cociente Alb/Glo) que se alteran en el curso de la leishmaniosis canina y de esta forma valorar la respuesta al tratamiento en los futuros casos clínicos.

Por último, dentro de este apartado, nos parece interesante destacar que los perros que presentan una disproteinemia marcada debido a una importante **hipoalbuminemia** son los que más difícilmente recuperan perfiles electroforéticos normales. En dos perros de nuestro estudio prospectivo, que iniciaron la terapia con una afección hepática, la albuminemia no llegó a normalizarse a pesar de haberse admitido su remisión. Otra causa de hipoalbuminemia pronunciada, presente en algunos casos, es una nefropatía (**Kontos et Koutinas, 1993**) que puede persistir incluso cuando hay una buena respuesta a la terapia. La proteinuria persistente en estos casos debe ser considerada durante el seguimiento para una correcta interpretación del cociente Alb/Glo (**Cabassu, 1988b**). Sin que podamos descartar la posibilidad de una respuesta favorable en estas situaciones, particularmente en nuestro estudio prospectivo los animales que presentaron al inicio del tratamiento un fallo renal respondieron en su mayoría desfavorablemente y tan sólo dos casos evolucionaron hacia el mantenimiento. Estos dos perros no sólo mantuvieron la hipoalbuminemia sino que, además, otras fracciones del proteinograma no llegaron a normalizarse por completo.

Asimismo, a la hora de interpretar el proteinograma debe tenerse siempre en cuenta, la posible concurrencia con otras enfermedades que también provocan alteraciones en el mismo, como la ehrlichiosis, que pueden ser la causa del retraso en la consecución de un perfil electroforético normal (**Sainz et al, 1993; Núñez-Torrón et al, 1996**).

VI.C -. EVOLUCION DE OTROS PARAMETROS

En el estudio prospectivo, tuvimos la oportunidad de estudiar la evolución del resto de los parámetros biopatológicos en los perros que alcanzaron la remisión y mantuvieron ésta a lo largo de un año.

Tras una terapia efectiva no sólo van a remitir los síntomas sino que también se produce una normalización de las alteraciones analíticas (**Kontos et Koutinas, 1993; Roze et Pages, 1994; Tesouro et al, 195c; Ferrer, 1997b**). Como ha sido comentado, en nuestro estudio prospectivo todas las alteraciones biopatológicas (en sus valores medios) observadas en el diagnóstico desaparecieron en el momento de la remisión. La evolución de estos valores permanecieron, a partir de entonces, dentro de los límites fisiológicos. No obstante, comprobamos cómo la práctica totalidad de los parámetros, aun dentro del rango fisiológico, sufren variaciones significativas con el paso del tiempo.

El programa estadístico utilizado nos permitió analizar esta evolución considerando, además, un segundo factor (junto con el tiempo). Así, dentro del grupo de perros que alcanzó la remisión, investigamos la posible influencia en la dinámica de los parámetros biopatológicos de una característica valorada antes del inicio del tratamiento (fase de enfermedad), de una característica observada a lo largo del mismo (respuesta a corto plazo) y de una característica sobre el futuro de los casos (recidiva).

Esto último nos parecía especialmente interesante ya que los estudios transversales previamente realizados sobre la relación de la recidiva con los parámetros laboratoriales en momentos concretos (tales como el de diagnóstico y el de remisión) se completaban considerando longitudinalmente la función tiempo.

Así, se comprobó la **interacción del tiempo con la fase y con la respuesta** a corto plazo en la evolución de los parámetros de la serie roja, de algunas fracciones del **proteinograma** y del **título de anticuerpos**, *interacción que debe ser considerada para interpretar y valorar la influencia de los factores de forma aislada*. La existencia de estas interacciones sugiere la necesidad de separar los animales en distintas categorías, en función de la fase de la enfermedad y en función de la respuesta a corto plazo, para poder estudiar y caracterizar correctamente la evolución de dichos parámetros en los perros que van a alcanzar la remisión.

La interacción entre dos factores cobra especial importancia cuando ésta anula la influencia provocada por cada uno de ellos por separado como parece suceder entre el tiempo y la recidiva cuando examinamos la **evolución de los linfocitos y de los eosinófilos**. En este sentido, se confirma una distinta y característica evolución de estos dos parámetros en los animales que van a presentar recidivas y en los que no. Concretamente, los perros que sufren recidiva presentan unos recuentos más elevados de linfocitos y eosinófilos en el momento del diagnóstico. Esta observación indica el posible papel pronóstico de estas dos variables, especialmente del recuento linfocitario, que más adelante trataremos.

Aun sin llegar a calcular la ecuación de la curva que más se ajusta a la evolución de cada parámetro estudiado, su expresión gráfica podría considerarse como un punto de referencia para **valorar la evolución de futuros casos**. El percentil de cada uno de estos parámetros en el que se encontrara un caso particular tratado con nuestro protocolo terapéutico (G1+Z-SC) sería indicativo de su porvenir. Estas curvas también permitirían valorar la eficacia relativa de otros protocolos de tratamiento.

VII – VALORACION PREDICTIVA DE LA RESPUESTA TERAPEUTICA

Entre los principales objetivos que nos marcamos al realizar este trabajo fue la obtención de resultados que nos permitieran predecir el futuro de los perros con leishmaniosis sometidos a terapia.

Muchas son las publicaciones en las que se analiza y discute el pronóstico de los casos pero casi siempre estos juicios hipotéticos sobre la evolución de los casos clínicos se califican cualitativamente. Actualmente, gracias a los avances informático-estadísticos, que permiten aplicar con rapidez y relativa sencillez métodos matemáticos de cálculo de probabilidades, cada vez son más las valoraciones cuantitativas que se van obteniendo sobre el porvenir (pronóstico) de los casos clínicos de una enfermedad determinada. Sin embargo y hasta lo que sabemos, en lo que se refiere a la leishmaniosis canina no existe ningún trabajo de este tipo.

Las aportaciones de nuestro estudio de predicción, aunque limitadas, irían encaminadas a proporcionar respuestas concretas a las preguntas que se plantean sobre el futuro de un caso de leishmaniosis canina en el que va a instaurarse un tratamiento, en particular, cuando se emplea Glucantime® (asociado a Zyloric®) siguiendo el protocolo empleado en el estudio prospectivo.

Mediante el empleo del análisis de regresión logística, pudimos calcular los *odds ratio* (probabilidades relativas) de los principales sucesos relativos a la evolución de los casos tratados. Dichos sucesos ya habían sido caracterizados previamente y se habían encontrado múltiples relaciones con distintas variables (consideradas de forma aislada) en distintos momentos. En este análisis se trataba, por una parte, de seleccionar sólo las variables que proporcionaran conjuntamente información complementaria (desechando aquellas que aportasen información redundante) y, por otra, de cuantificar su influencia.

Somos conscientes de que los *odds ratio* obtenidos, dado el limitado tamaño de la muestra de nuestro estudio, presentan unos intervalos de confianza relativamente amplios que deberían ser reducidos con futuros trabajos. No obstante, consideramos que los valores medios de estos *odds ratio* son lo suficientemente representativos y podrían constuir el principio de este tipo de aportaciones.

Entre los sucesos planteados, la **probabilidad de alcanzar la remisión** tras el tratamiento es, sin duda, el más frecuentemente valorado en la bibliografía consultada. Así, la gravedad del cuadro clínico es determinante en la emisión del pronóstico (Reusch *et Reiter*, 1987; Catarsini, 1988; Mancianti *et al*, 1988; Slappendel, 1988; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992). Efectivamente, en nuestro estudio este factor (representado por la fase de la enfermedad que presenta el caso en el momento del diagnóstico) fue la primera variable seleccionada por el programa estadístico a la hora de calcular la probabilidad relativa de que se produjera o no la remisión.

Una vez descartada esta variable cualitativa del análisis multivariante, la probabilidad de alcanzar la remisión va depender fundamentalmente de los valores que presente el animal (en el momento del diagnóstico) en cuatro parámetros biopatológicos, de entre todos los considerados, y en el siguiente orden: urea, ALT, recuento de neutrófilos y título de anticuerpos. Si tenemos en cuenta las variables que de forma aislada presentaron una asociación significativa con el suceso remisión observamos cómo entre éstas la urea, la ALT y el recuento de neutrófilos aportan información complementaria para predecir dicho suceso, mientras que las variables albúmina y cociente Alb/Glo, igualmente relacionadas con la remisión, son sustituidas por el título de anticuerpos con el que guardan una correlación significativa.

Las cuatro variables seleccionadas presentan una relación inversa con la probabilidad de alcanzar la remisión. La presencia de un fallo hepático o renal (habitualmente evidenciados por un un aumento patológico de la ALT o de la urea, respectivamente) han sido reiteradamente señalados como indicativos de mal pronóstico (Slappendel, 1988; Cairó *et Font*, 1991; Ferrer, 1992). El análisis de regresión logística no solo nos permite confirmar que estas dos variables son las que más decisivamente van a influir en el hecho de que se produzca o no la remisión sino que, además, es capaz de cuantificar tal influencia.

Aplicando la fórmula 1 podemos precisar que a partir de 73 mg/dl de urea (cuando el valor de la ALT está en el límite fisiológico superior, es decir, 44 U/l) o a partir de 116 U/l de ALT (cuando el valor de la urea está en el límite fisiológico superior, es decir, 40 mg/dl) los *odds ratios* obtenidos serán menores de 1 y, por tanto, a partir de estos valores la probabilidad de alcanzar la remisión será menor que la de no alcanzarla.

El número de neutrófilos (absoluto) y el título de anticuerpos (inverso) (IFI) aportan información adicional en esta relación. Aunque no hemos encontrado ninguna referencia concreta acerca de la influencia de los neutrófilos en la consecución o no de la remisión, el hecho de que a medida que aumenta el recuento de estos leucocitos disminuya la probabilidad de que se consiga la remisión, podría sugerir la existencia de complicaciones secundarias a sobreinfección (Giauffret *et al*, 1976; Groulade 1977; Cabassu, 1988b), que podrían dificultar una respuesta efectiva al tratamiento. El valor pronóstico del título de anticuerpos ha sido muy cuestionado y, de hecho, algunos autores mantienen que la tasa de anticuerpos no muestra relación con la gravedad del proceso (Dunan, 1978; Lanotte *et al*, 1979; Mancianti *et al*, 1988; Abranches *et al*, 1991a; Vercamen *et De Deken*, 1996; Denerolle, 1996) y, por extensión, con la respuesta terapéutica (Ferrer *et al*, 1995).

Sin embargo, como ya ha sido señalado en distintos apartados del presente trabajo, el título de anticuerpos se muestra como un parámetro a considerar en el seguimiento de los perros tratados (Giauffret *et Tallercio*, 1971; Dunan, 1978; Reitter *et al*, 1985; Euzeby, 1988; Franc, 1993; Poli *et al*, 1997). Con respecto al momento del diagnóstico, el hecho de que se hallara una asociación entre títulos de anticuerpos más bajos que la media, el cuadro asintomático y la fase inicial de la enfermedad, junto con la mejor respuesta terapéutica observada en este grupo de animales, podría explicar la selección de la tasa de anticuerpos como factor de riesgo en la probabilidad de que se alcance o no la remisión.

Utilizando la fórmula 2, podemos determinar la probabilidad de que se consiga o no la remisión en función de la fase de la enfermedad en que se instaure el tratamiento. Para calcular estos *odds ratio* y a modo de ejemplo tomamos los valores medios de las variables seleccionadas como factores de riesgo (urea, ALT, neutrófilos y título de anticuerpos) obtenidos en el momento del diagnóstico dentro de cada una de las fases de la enfermedad:

FASE	O.R.	PROBABILIDAD DE REMISION (%)
FASE I	71.82	98.63
FASE E	29.77	96.75
FASE A	0.037	3.57

Entre los casos que alcanzan la remisión los que están en fase de estado son los que presentan una mayor variabilidad en la respuesta a corto plazo a la terapia. Por tal motivo, nos propusimos calcular, en este grupo de animales, la probabilidad relativa de obtener una **respuesta favorable frente a una muy favorable**.

Teniendo en cuenta que todos los animales incluidos en este análisis de regresión logística van a remitir, resulta lógico que el programa descarte las variables que actúan como factores de riesgo en la consecución o no de la remisión. En cambio parece razonable que seleccione, de entre el resto de los parámetros biopatológicos, alguno de los que presentaron relación con el tipo de respuesta a corto plazo cuando se caracterizó ésta (por ejemplo, alguno de la serie roja). En particular, el número de glóbulos rojos es el que aporta mejor información para pronosticar este tipo de respuesta. Este posible valor pronóstico de la serie roja, como ha sido señalado, ya fue sugerido por Gascon (1994) (Gascón, 1994).

Entre las posibles variables que pudieran verse implicadas en la probabilidad de **presentación o no de efectos colaterales** en el curso del tratamiento, el análisis multivariante selecciona sólo la concentración de α -globulinas. Aunque las fluctuaciones observadas en los casos de leishmaniosis quedan mayoritariamente englobadas dentro del rango fisiológico, una elevación de esta fracción de globulinas parece ser una constante de los perros que van a presentar efectos secundarios, como previamente habíamos puesto de manifiesto en la discusión de la caracterización de los efectos colaterales. En cualquier caso, somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio ya que, debido a la variedad de efectos colaterales que pueden presentarse en el curso del tratamiento con Glucantime® y alopurinol, se hizo necesaria la agrupación de todos ellos con el fin de llegar a alguna conclusión.

Una cuestión que a menudo plantean los propietarios de los perros enfermos que van a ser sometidos a terapia es la que se refiere a la duración y coste del tratamiento que se va a aplicar. Por esta razón nos pareció interesante averiguar la probabilidad relativa de que un animal vaya a recibir **un ciclo o más de un ciclo de tratamiento (G1+Z-SC)** hasta alcanzar la remisión.

El test estadístico selecciona, entre todos los parámetros considerados en el momento del diagnóstico, el cociente Alb/Glo y la concentración de hemoglobina como factores con valor predictivo. Lógicamente en este estudio esperábamos la selección de alguno de los parámetros del proteinograma, ya que éste formaba parte de los criterios considerados para dar por finalizado o prolongar el tratamiento. De entre las distintas variables del proteinograma correlacionadas con el número de ciclos administrados para alcanzar la remisión, el test elige sólo el cociente Alb/Glo, dado que el resto de las fracciones aporta información redundante. Algo parecido sucedería con los parámetros de la serie roja, ya que aunque los tres se correlacionan con el número de ciclos administrados hasta la remisión en el análisis de regresión logística sólo queda seleccionada la hemoglobina.

Aplicando la fórmula 5 de nuestros resultados observamos que la probabilidad de administrar más de un ciclo de tratamiento hasta alcanzar la remisión supera a la probabilidad de administrar un solo ciclo, cuando el cociente Alb/Glo cae por debajo de 0.28. Si consideramos los dos factores (cociente Alb/Glo y hemoglobina) (fórmula 6), una concentración de hemoglobina por debajo de 8.3 g/dl en el momento del diagnóstico pronostica igualmente la aplicación de más de un ciclo de tratamiento hasta alcanzar la remisión, cuando consideramos un cociente Alb/Glo de 0.5 (valor medio obtenido en el momento del diagnóstico en el grupo de animales que remite).

Finalmente, a la hora de calcular la **probabilidad de presentación de recidiva** en aquellos animales que alcanzaron la remisión, se consideraron los valores de las variables en dos momentos de nuestro estudio: el de diagnóstico y el de remisión.

Aunque en la caracterización de la recidiva (en el momento del diagnóstico) se detecta una asociación significativa con cinco parámetros biopatológicos (β -globulinas, Alb/Glo, glóbulos blancos, linfocitos y eosinófilos) el programa de regresión logística selecciona sólo uno de ellos, el recuento de linfocitos, como factor decisivo para predecir la presentación o no de la recidiva. Del mismo modo, en el momento de la remisión, el número de linfocitos se muestra como el parámetro más determinante en esta predicción.

Si consideramos los dos momentos simultáneamente, el número de linfocitos obtenido en el momento de la remisión aporta información redundante por lo que queda excluido como factor predictivo. En este caso, el recuento linfocitario inicial junto con el valor de la concentración de hemoglobina obtenido en el momento de remisión permiten, aunque éste último en menor medida, calcular la probabilidad de recidiva.

Como se recoge en el capítulo de revisión bibliográfica, múltiples estudios sobre la inmunopatología de la leishmaniosis han dejado constancia del papel que juegan los linfocitos en la patogenia de la enfermedad. En nuestro estudio, los linfocitos (valorados exclusivamente a través de su número absoluto) sólo han sido asociados con el suceso de recidiva. Según nuestros resultados, el recuento linfocitario no presentó relación con ninguna variable cualitativa o cuantitativa (si exceptuamos el número total de globulos blancos) cuando caracterizamos la muestra del estudio prospectivo.

Igualmente, cuando se caracterizaron las respuestas a corto y medio plazo, se evidenció la ausencia de asociación entre el tipo de respuesta y el recuento linfocitario y sólo cuando valoramos la respuesta a largo plazo el valor medio de linfocitos observado, tanto en el momento de diagnóstico y de remisión como el obtenido en los distintivos controles realizados a lo largo de una evolución de 9 meses de permanencia en remisión, presentó una asociación significativa con el suceso recidiva.

En principio, esta relación se justificaría fácilmente si los animales que presentaron un número inferior de linfocitos hubieran sido los que presentaron un mayor porcentaje de recidivas, interpretándose este menor recuento como una reducción en el número de células efectoras de la inmunidad celular. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que esta relación es inversa, es decir, el grupo de animales en que presenta recidiva es el que muestra un **valor medio más alto de linfocitos**.

Analizando detalladamente la distribución de los casos en función del recuento linfocitario y la respuesta a largo plazo confirmamos que los animales que presentan recuentos más elevados de linfocitos son los que muestran una mayor proporción de recidivas:

EVOLUCION A LARGO PLAZO / LINFOCITOS (/mm ³)	RECIDIVA SI <i>n</i>	RECIDIVA NO <i>n</i>	TOTAL <i>n</i>
< 1000	1	5	6
1000 - 2900	6	22	28
2901 - 4800	6	4	10
> 4800	4	0	4
TOTAL	17	31	48

 $\chi^2: 13.2537$

g.l.: 3

 $p = 0.004$

Distribución de los casos que alcanzaron la remisión (con el protocolo G1+Z-SC), en función del recuento linfocitario (obtenido en el momento del diagnóstico) y la respuesta a largo plazo (recidiva sí o no).

Efectivamente, vemos cómo todos los perros del estudio prospectivo con linfocitosis en el momento del diagnóstico recidivaron. Pero además observamos que, dentro del grupo de animales con recuentos normales de linfocitos, aquellos que mostraron unos valores más elevados presentaron una proporción de recidiva mucho mayor. Por el contrario, los casos con recuentos linfocitarios más bajos permanecieron, en su mayoría, libres de recidiva durante todo el tiempo de seguimiento.

Quizas en estos linfocitos podría existir un predominio de la población Th2 (población que estaría involucrada en la susceptibilidad a la enfermedad (Cox *et Liew*, 1992; Bogdam *et al*; Pinelli *et al*, 1995)). Al ser esta población responsable de la producción de linfoquinas (IL-4, IL-5 y IL-6) que estimularían a los linfocitos B (Cox *et Liew*, 1992; Tizard, 1996b) cabría esperar un mayor título de anticuerpos en estos animales (relación no confirmada en este estudio). Por otro lado, ya que la IL-5 es considerada como un factor importante en el crecimiento y diferenciación de los eosinófilos (Cox *et Liew*, 1992), también cabría esperar que un predominio de linfocitos Th2 se acompañara de unos recuentos altos de eosinófilos. Aunque no se detectó eosinofilia en el grupo de perros del estudio prospectivo que presentó recidiva, sí se observó un valor medio inicial de eosinófilos significativamente más alto que en el grupo que permaneció en remisión durante todo el seguimiento, lo que apoyaría la hipótesis precedente.

Como ha sido señalado antes, en la caracterización de la muestra ($n=61$) no llega a establecerse una correlación significativa entre los recuentos de linfocitos y de eosinófilos. No obstante, cuando limitamos la muestra a los 48 animales que remitieron, la correlación entre estos dos tipos de leucocitos alcanzó niveles de significación ($r=0.2884$; $p<0.05$). La existencia de esta correlación podría explicar la exclusión de los eosinófilos como factor de riesgo para el suceso recidiva (a pesar de estar asociados con él) en el estudio de regresión logística, ya que la información que aportarían sería redundante.

Para dar respuesta a estas últimas observaciones, sería necesario realizar investigaciones más profundas acerca del papel que desempeñan los distintos tipos de glóbulos blancos y caracterizar la población de linfocitos presente en sangre circulante, no sólo en el curso de la enfermedad sino también a lo largo del seguimiento tras la terapia.

CONCLUSIONES

1ª -. Las respuestas terapéuticas obtenidas a corto, medio y largo plazo con la administración de dosis diarias altas de Glucantime® (asociado o no a alopurinol) son independientes de que el antimonial se aplique por vía subcutánea o intramuscular.

2ª -. La respuesta terapéutica a corto plazo depende de la dosis diaria de Glucantime®, independientemente de que el antimonial se asocie o no a alopurinol, estimándose un $58\pm 4.3\%$ de respuesta muy favorable cuando se administran dosis diarias altas frente a un $29.4\pm 7.8\%$ de este tipo de respuesta empleando dosis diarias bajas del antimonial.

3ª -. La respuesta terapéutica a corto y medio plazo se muestra independiente de la edad y del sexo y, sin embargo, presenta una asociación significativa con la fase de la enfermedad, estimándose un $88.4\pm 4.9\%$ de respuesta muy favorable en fases iniciales frente a un $14.3\pm 6.6\%$ de respuestas favorables en fases avanzadas.

4ª -. Estimamos que en las fases de estado de la enfermedad el promedio de ciclos hasta alcanzar la remisión administrando dosis diarias bajas de Glucantime® es de 2.92 ± 0.39 , mientras que con dosis diarias altas es prácticamente de la mitad (1.4 ± 0.1), lo que supone la administración de dosis totales equivalentes de Glucantime® hasta alcanzar la remisión.

5ª -. Estimamos que la tasa media de remisión (con independencia de la dosis diaria y de la vía de administración del antimonial) se sitúa en el $70.3\pm 3.6\%$.

6ª -. El descenso del título de anticuerpos, la normalización del proteinograma y del eritrograma, junto con el aumento en el recuento de linfocitos caracterizan la consecución y el mantenimiento de la remisión.

7ª -. Estimamos que en el $31\pm 4.3\%$ de los casos que alcanzan la remisión tras la estiboterapia se produce un descenso del título de anticuerpos (por inmunofluorescencia indirecta) por debajo del umbral de positividad, durante el primer año de seguimiento.

8ª -. La tasa media de recidivas tras una terapia antimonial efectiva queda estimada en un $39.6\pm 4.5\%$, con un tiempo medio de presentación de la misma de 13.7 ± 1 meses.

9ª -. Las tasas acumuladas de permanencia en remisión tras una estiboterapia efectiva pueden estimarse, al año de iniciado el tratamiento, en un $73.2 \pm 4.6\%$ y a los dos años en un $49.6 \pm 6.8\%$, siendo estas tasas significativamente mayores para el grupo diagnosticado en fase inicial que para el que parte en fase de estado de la enfermedad.

10ª -. El estudio de regresión logística llevado a cabo en el grupo tratado con Glucantime®, vía subcutánea y a dosis diarias altas, asociado a alopurinol determina que:

PRIMERO - la concentración plasmática de urea y de ALT y, en menor grado, el recuento de neutrófilos y el título de anticuerpos, en el momento de instaurar la terapia, tienen un valor pronóstico en la probabilidad relativa de que se consiga o no la remisión,

SEGUNDO - ante una respuesta favorable, la probabilidad relativa de recibir uno o más de un ciclo de tratamiento hasta la remisión puede estimarse a partir del valor del cociente albúmina/globulinas y de la concentración de hemoglobina obtenidos en el momento del diagnóstico,

TERCERO - la concentración inicial de α -globulinas se muestra como un factor de riesgo en la probabilidad relativa de que se desarrollen o no efectos colaterales durante la administración del tratamiento,

CUARTO - a medida que el recuento linfocitario, tanto en el momento del diagnóstico como en el de la remisión, es mayor la probabilidad de que se presente la recidiva aumenta.

RESUMEN

El presente trabajo se compone de dos estudios acerca de la evolución de la leishmaniosis canina natural tras el tratamiento específico de la enfermedad.

En el **primer estudio (retrospectivo)** se lleva a cabo una revisión de 104 historias clínicas, pertenecientes a perros afectados de la enfermedad, en la que se valora la respuesta terapéutica a corto (muy favorable, favorable, nula o desfavorable), medio (remisión sí o remisión no) y largo (recidiva sí o recidiva no) plazo tras la administración intramuscular de uno o varios ciclos (20 inyecciones) de tratamiento a base de antimonio de meglumine (Glucantime®), siguiendo dos protocolos distintos en cuanto a la dosificación diaria (dosis altas: 100-150 mg/kg/día o dosis bajas: 50-100 mg/kg/día), asociado o no alopurinol (Zyloric®) a dosis de 10-20 mg/kg/día oral.

Nuestros resultados demuestran que la respuesta a corto plazo es mejor cuando se aplican dosis altas del antimonial, con independencia de que éste se asocie o no a alopurinol. Sin embargo, tras la repetición de los ciclos de tratamiento se consiguen unos porcentajes de remisión y de recidiva similares con ambos protocolos. Entre las variables consideradas, el sexo y la edad no muestran relación alguna con la evolución de los casos tratados, mientras que la fase de la enfermedad en la que se instaura la terapia se asocia de manera estadísticamente significativa con el tipo de respuesta observada, tanto a corto como a medio y largo plazo.

Asimismo, en este primer estudio se analiza la dinámica de dos de los parámetros más relevantes en el seguimiento de los perros tratados, el título de anticuerpos y el cociente albúmina/globulinas (Alb/Glo), a lo largo de un año de permanencia en remisión.

El **segundo estudio (prospectivo)** consiste en un ensayo clínico sobre 61 casos de leishmaniosis canina sometidos a un tratamiento antimonial (150 mg/kg/día) por vía subcutánea, en ciclos de 20 inyecciones, asociado a alopurinol (10 mg/kg/12 h). Los resultados indican que la efectividad del tratamiento a dosis altas de Glucantime® es estadísticamente independiente de que el antimonial se aplique por vía subcutánea o intramuscular.

En este estudio prospectivo se caracteriza cada una de las respuestas observadas (a corto, medio y largo plazo) en función de distintas variables cualitativas (sexo, edad, fase de la enfermedad, etc.) y cuantitativas (título de anticuerpos, proteinograma, hemograma, etc.). Además, se analiza con detalle la evolución de estos parámetros biopatológicos tras un tratamiento efectivo.

Este estudio se completa con un análisis de regresión logística capaz de seleccionar y cuantificar la influencia de las variables que tienen valor predictivo sobre el futuro de los casos tratados. Entre los parámetros biopatológicos, los valores de urea y ALT, seguidos del recuento de neutrófilos y del título de anticuerpos (en el momento del diagnóstico), se muestran como factores con capacidad predictiva en la probabilidad de que se alcance o no la remisión; la concentración de α -globulinas (en el diagnóstico) determina la probabilidad de aparición o no de efectos colaterales y el recuento linfocitario (tanto en el momento del diagnóstico como en el de la remisión) actúa como factor predictivo en la probabilidad de presentación o no de recidiva.

Por último, se realiza un **estudio de supervivencia** (permanencia en remisión) en el que se pone de manifiesto que las tasas acumuladas de permanencia en remisión pueden considerarse iguales para los distintos tratamientos y significativamente diferentes según la fase de la enfermedad en la que se instaure la terapia, estimándose unas tasas de permanencia en remisión, a los tres años de seguimiento, de un $58.4 \pm 12.6\%$ para el grupo de perros diagnosticado en fase inicial y de un $26.4 \pm 10.1\%$ para los animales que iniciaron la terapia en fase de estado de la enfermedad.

SUMMARY

The present work is composed of two studies about the therapeutical response in naturally acquired canine leishmaniasis.

In the **first study (retrospective)** a review of 104 clinical cases treated with two different dosage regimens of meglumine antimoniate (Glucantime®), given intramuscularly (IM) in one or more courses of 20 injections (high dosage regimen: 100-150 mg/kg s.i.d; low dosage regimen: 50-100 mg/kg s.i.d) associated or not with allopurinol (Zyloric®) (10-20 mg/kg/day per os), is carried out. Our results demonstrate that short-term response is better when administering the high dosage regimen rather than the low, independently of the administration or not of allopurinol. Nevertheless, the percentage of remission is similar in both groups (as a result of the treatment courses repetition). Among the different variables considered in this study, age and sex are not related to the therapeutical response while the stage of the disease in which therapy was started is significantly related to the short, medium and long-term response. On the other hand, the evolution of antibody titre and albumin/globulin (Alb/Glo) ratio during a one year period of remission is also assessed.

The **second study (prospective)** consists of a clinical trial over 61 cases of canine leishmaniasis under meglumine antimoniate (Glucantime®), given subcutaneously (SQ) in one or more courses of 20 injections (150 mg/kg s.i.d 10 d, 10 d free, 10 d) in association with allopurinol (Zyloric®) (10 mg/kg/12 h per os). Our results indicate that therapeutical response degree, under a high dosage regimen of Glucantime®, does not depend on the route (IM or SQ) of the antimonial administration. In this prospective study a characterization of the short, medium and long-term therapeutical response, according to several qualitative (age, sex, stage of the disease, etc.) and quantitative (antibody titre, electrophoretogram, hemogram, etc.) is performed. Furthermore, the evolution of these parameters after an effective treatment are analyzed in detail.

This study is completed by a multiple regression analysis in order to select and quantify the influence of variables that are predicted values for the future of the treated patients. Among the biopathological parameters, urea and ALT levels, followed by PMNC count and antibody titre act as risk factors in the probability of achieving the remission; α -globulin concentration acts as a risk factor in the probability of side-effects presentation and lymphocyte count acts as a risk factor in the probability of relapse after remission.

Finally, a **survival distribution analysis** showing that the relapse free cumulative proportion are similar in all therapeutical groups but significantly different according to the stage of the disease, is performed. It is estimated that, among the dogs which achieve the remission, $58.4 \pm 12.6\%$ of the dogs diagnosed in initial stages and $26.4 \pm 10.1\%$ of those diagnosed with established disease, remain relapse free three years after starting therapy.

BIBLIOGRAFIA

- Abranches, P; Conceicao-Silva, FM; Ribeiro, MMS; Lopes, FJ; Teixeira-Gómez, L.: Kala-azar in Portugal. IV. The wild reservoir: the isolation of *Leishmania* from a fox. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77: 420-421, 1983.
- Abranches, P; Silva-Pereira, ACD; Conceição-Silva, FM; Santos-Gomes, GM; Janz, G.: Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77(4): 557-561, 1991a.
- Abranches, P; Santos-Gomes, G; Rachamim, N; Campino, L; Schnur, LF; Jaffe, CL.: An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 13: 537-550, 1991b.
- Acedo, C; Martín, J; Vélez, D; Sanchís, MC; Louassini, M; Maldonado, JA; Morillas, F.: Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Intern J Parasitol*, 25(3): 303-10, 1996.
- Aceña, C; Rodés, D; Palacio, J; Sánchez, E; Llabrés, F; Gascón, M.: Estudio del mielograma en perros afectados de leishmaniosis. *XXXII Congreso Nacional de AVEPA*, pp. 317-318, Sevilla 2/5 Oct, 1997.
- Aebischer, T; Vorberg, I; Misslitz, AC; Wiese, M.: Transgenic *Leishmania sp* to study parasite persistence in the immune host. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 21, Istanbul, 1997.
- Afonso, LCC; Scharton, TM; Vieira, LQ; Wysocka, M; Trinchieri, G; Scott, P.: The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*, 263: 235-237, 1994.
- Aguiló, J. (comunicación oral): Mesa redonda sobre la situación actual de la leishmaniosis canina. *AMVAC*, 28 May, Madrid, 1994.
- Alexander, J.: Vaccination and the immunological control of leishmaniasis. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Science, vol. 163), pp., 839-843. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Alexander, J et Russell, DG.: Interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in Parasitology*, 31: 175-254, 1992.
- Aisa Nache, M^a J.: La técnica de western blot en la detección de la infección por *Leishmanis infantum* en el perro y en el control de su evolución (*Tesis doctoral*). Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries. Laboratori de Parasitologia. Divisió de Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona, 1997.
- Al Jaser, M; El-Yazigi; Kojan, M; Croft, SL.: Skin uptake, distribution and elimination of antimony following administration of sodium stibogluconate to patients with cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(2): 516-519, 1995.
- Alvar, J et Ortiz, M.: Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en la provincia de Madrid. *Rev Ibér Parasitol, Vol Extraordinario*, pp 45-50, 1987.
- Alvar, J; Gutiérrez-Solar, B; Molina,R; López-Vélez, R; García-Camacho, A; Martínez, P; Laguna, F; Cercenado, E; Galarnes, A.: Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. *Lancet*, 339(6): 1427, 1992.
- Alvar, J; Molina, R; San Andrés, M; Tesouro, M; Nieto, J; Vitutia, M; González, F; San Andrés, MD; Boggio, J; Rodríguez, F; Sáinz, A; Escacena, C.: Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Paras*, 88(4): 371-378, 1994.
- Alvar, J; Amela, C; Molina, R.: El perro como reservorio de la leishmaniosis. *Med Vet*, 12(7-8): 431-439, 1995.
- Alvar, J; Cañavate, C; Gutiérrez-Solar, B; Jiménez, M; Laguna, F; López-Vélez, R; Molina, R; Moreno, J.: *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 10(2): 298-319, 1997.
- Alving, CR; Steck, EA; Hanson, WL; Loizeaux, PS; Chapman, WL Jr; Waits, VB.: Improved therapy of experimental leishmaniasis by use of a liposome-encapsulated antimonial drug. *Life Sci*, 22: 1021-1026, 1978a.
- Alving, CR; Steck, EA; Chapman, WL Jr; Wits, VB; Hendricks, LD; Swartz, GM Jr; Hanson, WL.: Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drug. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75(6): 2959-2963, 1978b.

- Alving, CR; Steck, EA; Chapman, WL; Waits, VB; Hendricks, LD; Swartz, GM; Hanson, WL.: Liposomes in leishmaniasis: therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinolines and tetracycline. *Life Sci*, 26: 2231-2238, 1980.
- Amela, C; López-Gay, D; Alberdi, JC; Castilla, J.: Injecting drug use as risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients. *Europ J Epidemiol*, 12: 91-92, 1996.
- Antczak, D et Gorman, NT.: Interacciones celulares en las respuesta inmunitarias. En: *Inmunología Clínica Veterinaria*, pp. 112-140. Ed. by Halliwell, R et Gorman, NT. Acribia S.A, Zaragoza 50086, 1992 (original: Saunders, 1989).
- Arboix, M. (comunicación oral): *Curso de Enfermedades Vectoriales*, pp.19-22, 23-24/Sep, Madrid, 1995.
- Aronson, N; Jackson, J; Magil, A; Wortmann, G; Oster, C.: Sodium stibogluconate therapy for leishmaniasis: the experience of the american military 1989-1996. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 177, Istanbul, 1997.
- Ashford, RW; Desjeux, P; deRaadt, P.: Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, 8(3): 104-105, 1992.
- Ayats, A.: El diagnóstico de la uveítis en la leishmaniosis. *Veterinaria en Madrid*, 34: 28-31, 1996.
- Azazy, AA; Devaney, E; Chance, ML.: A PEG-ELISA for the detection of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88: 62-66, 1994.
- Balaña-Fouce, R et Alunda, JM.: The antiproliferative effect of berenil on *Leishmania infantum* promastigotes is not reverted by exogenous polyamines. *Med Sci Res*, 19: 815-816, 1991.
- Barker, DC; McCann, S; Lambson, B; Fu, G; Rodríguez, N; Brewster, S.: Diagnostic PCR for *Leishmania* using sequences from the conserved region of kinetoplast minicircle DNA: scope and limitations. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 89, Istanbul, 1997.
- Barral-Netto, M; Badaró, R; Barral, A; Almeida, RP; Santos, SB; Badaró, F; Pedral-Sampaio, D; Carvalho, EM; Falcoff, E; Falcoff, R.: Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 163: 853-857, 1991.
- Barta, O.: Immunoadjuvant therapy. En: *Kirk's Current Veterinary Therapy XI. Small Animal Practice*, pp. 217-223. Ed. by Kirk and Bonagura. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1992.
- Bartges, JW; Osborne, CA; Felice, LJ; Unger, LK; Chen, M.: Influence of allopurinol and two diets on 24-hour urinary excretions of uric acid, xanthine and ammonia by healthy dogs. *Am J Vet Res*, 56(5): 595-599, 1995.
- Barthet, M; Brunet, P; Bernard, JC; Dussol, B; Rodor, F; Jouglard, J; Berland, Y; Sahel, J.: Pancréatite aiguë au cours d'un traitement par l'antimoniato de méglumine (Glucantime®). *Gastroenterol Clin Biol*, 18: 90-92, 1994.
- Baumann, RJ; McCann, PP; Bitonti, AJ.: Suppression of *Leishmania donovani* by oral administration of a bis(benzyl)polyamine analog. *Antimicrob Agents Chemoth*, 35(7): 1403-1407, 1991.
- Beaufils, JP; Martin-Granel, J; Jumelle, P.: Gammapathie monoclonale dans la leishmaniose canine: à propos d'un cas. *Bull Acad Vét France*, 69(1): 103-110, 1996.
- Belloli, C; Ceci, L; Carli, S; Tassi, P; Montesissa, C; de Natale, G; Marcotrigiano, G; Ormas, P.: Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 58: 123-127, 1995.
- Ben Said, M; Mili, A; Amri, F; Kharrat, H.: Resistance to N-Methylglucamine in Tunisian visceral leishmaniasis children. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 184, Istanbul, 1997.
- Berenger, A.: Proposition d'une modalité particulière de traitement de la leishmaniose canine. Guérison possible. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 111-119, 1988.
- Berenguer, J; Moreno, S; Cercenado, E; Bernaldo de Quirós, JCL; García de la Fuente, A; Bouza, E.: Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Internal Med*, 111: 129-132, 1989.

- Berens RL; Marr, JJ; Nelson, DJ; LaFon, SW.: Antileishmanial effect of allopurinol and allopurinol ribonucleoside on intracellular forms of *L. donovani*. *Biochem Pharmacol*, 29:2397-2398, 1980.
- Bergeaud, P.: L'apport de la corticothérapie dans le traitement de certaines formes de leishmaniose canine: résultats sur une série de quarante-trois cas. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23: Suppl. 5, pp. 121-127, 1988.
- Berger, BJ et Fairlamb, AH.: Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. *Parasitol*, 105 Suppl: S71-S78, 1992.
- Berman, JD et Wyler, DJ.: An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J Infect Dis*, 142(1): 83-86, 1980.
- Berman, JD et Webster, HK.: *In vitro* effects of mycophenolic acid and allopurinol against *Leishmania tropica* in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemoth*, 21(6):887-891, 1982.
- Berman, JD.: Experimental chemotherapy of leishmaniasis - A critical review. *Elsevier Science Publishers BW* (Biochemical Division), pp. 111-138, 1985a.
- Berman, JD; Waddell, D; Hanson, BD.: Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agen Chemoth*, 27(6): 916-920, 1985b.
- Berman, JD et Gallalee, JV.: Antileishmanial activity of human red blood cells containing formycin A. *J Infect Dis*, 151(4): 698-703, 1985c.
- Berman, JD; Hanson, WL; Chapman, WL; Alving, CR; López Berestein, G.: Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. *Antimicrob Agen Chemoth*, 30(6): 847-851, 1986a.
- Berman, JD; Gallalee, JV; Williams, JS; Hockmeyer, WD.: Activity of pentamidine-containing containing red cell ghosts against visceral leishmaniasis in the hamster. *Am Soc Trop Med Hyg*, 35(2): 297-302, 1986b.
- Berman, JD et Grogil, M.: Biochemical mechanisms of Pentostam. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Science, vol. 163), pp., 473-478. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Berman, JD; Kosionski, G; Chapman, WL; Waits, VB; Hanson, WL.: Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil®) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agen Chemoth*, 36(9): 1978-1980, 1992.
- Berrahal, F; Mary, C; Roze, M; Berenger, A; Escoffier, K; Lamouroux, D; Dunana, S.: Canine Leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*, 55(3): 273-77, 1996.
- Bettini, S; Pozio, E; Gradoni, L.: Leishmaniosis in Tuscany (Italy). II. *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74(1): 77-83, 1980.
- Bhattacharyya, R; Das, K; Sen, S; Symal, R; Majumder, HK.: Development of a genus specific primer set for detection of *Leishmania* parasites by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett*, 135: 195-200, 1996.
- Bin hazim, AA; Chapman, WL; Shin, SS; Hanson, WL.: Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania infantum* in hamsters and dogs. *Am J Vet Res*, 54(1): 113-120, 1993.
- Blanc, Ch et Robert, A.: Cinquième observation de kala-azar congénital. *Press Med*, 13(28): 1751, 1984.
- Blood, DC; Sttudet, VP.: Cytokines. En: *Baillière's Comprehensive Veterinary Dictionary*, p. 251. Ed. by Blood, DC et Sttudet, VP. Baillière Tindall - WB Saunders, London NW1 7DX, 1990.
- Bogdan, C; Gessner, A; Rollinghoff, M.: Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiol*, 189: 356-396, 1993.
- Botet Fregola, J; Portús Vinyeta, M.: La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912 -1985). *Rev San Hig Púb*, 67: 255-266, 1993.

- Bourdeau, P.: Eléments de la relation hôte-parasite au cours de l'infection leishmanienne et conséquences. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 57-72, 1988.
- Bourdeau, P.: Physiopathologie de la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. *Médecine et Armées*, 22(1): 15-22, 1994.
- Bourdoiseau, G.: La leishmaniose canine. *Rhône Mérieux*, 1993.
- Brabin, L et Brabin, BJ.: Parasitic infections in women and their consequences. *Parasitology*, 31: 1-81, 1992.
- Brandonisio, O; Altamura, M; Ceci, L; Antonaci, S; Jirillo, E.: Evaluation of non-specific immunity in canine leishmaniasis. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Science, vol. 163), pp., 395-400. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Brandonisio, O; Panunzio, M; Faliero, SM; Ceci, L; Fasanella, A; Puccini, V.: Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 53: 95-103, 1996.
- Bravo, L; Frank, LA; Brennenan, KA.: Canine leishmaniasis in the United States. *Small Anim Paras*, 15(5): 699-708, 1993.
- Bray, RS et Lainson, R.: The immunology and serology of leishmaniasis. V. The use of particles as vehicles in passive haemagglutination tests. *Trans R Soc Trop Med Hig*, 61: 490-505, 1967.
- Bryceson, ADM; Chulay, JD; Ho, M; Mugambii, M; Were, JB; Muigai, R; Chunge, C; Gachihi, J; Meme, G; Anabwani, G; Bhatt, SM.: Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs I. Clinical and immunological studies. *Trans R Soc Trop Med Hig*, 79: 700-704, 1985a.
- Bryceson, ADM; Chulay, JD; Mugambii, M; Were, JB; Gachihi, G; Chunge, CN; Muigai, R; Bhatt, SM; Ho, M; Spencer, HC; Meme, J; Anabwani, G.: Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs II. Response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. *Trans R Soc Trop Med Hig*, 79: 705-714, 1985b.
- Buffet, PA; Garin, YJF; Sulahian, A; Nassar, N; Derouin, F.: Therapeutic effect of reference antileishmanial agents in murine visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Ann Trop Med Parasitol*, 90(3): 295-302, 1996.
- Buracco, P et Grazi Gallo, M.: Bone lesions caused by *Cryptococcus laurentii* associated with subclinical visceral leishmaniasis in a dog. *Canine Practice*, 15(2): 5-11, 1990.
- Buracco, P; Abate, O; Guglielmino, R; Morello, E.: Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *J Small Anim Pract*, 38: 29-30, 1997.
- Bush, BM: En: *Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians*. Ed. by Bush. Blackwell Scientific Publications, Victoria 3053, Australia, 1991.
- Bussieras, J.: Problèmes épidémiologiques. *Anim Comp*, 2: 105-109, 1977a.
- Bussieras, J.: Les thérapeutiques antileishmaniennes. *Anim Comp*, 2: 137-141, 1977b.
- Cabassu, JP; Gervais, P; Seguret, N.: Manifestations cliniques de la leishmaniose canine. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 29-34, 1988a.
- Cabassu, JP; Gervais, P; Seguret, N; Rousset-Rouvière, B.: Bilan biologique chez le chien leishmanien. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 35-42, 1988b.
- Cabral, M; Grady, JO; Alexander, J.: Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite immunol*, 14: 531-539, 1992.
- Cairó, J et Font, J.: Leishmaniosis canina. Aspectos clínicos. *Clin Vet Peq Anim*, 2: 73-81, 1991.
- Cairó, J.: Ehrlichiosis canina. *XXIX Congreso Nacional de AVEPA*, pp. 155-160, Barcelona 14/16 Oct, 1994.
- Cairó, J.: Chancro de inoculación en la leishmaniosis canina. Casos clínicos. *Curso de Enfermedades Vectoriales*, pp.19-22, 23-24/Sep, Madrid, 1995.

- Cairó, J et Muntané, C.: Chancro de inoculación en la leishmaniosis canina. Dos años después. *XIV Jornadas Anuales AMVAC*, 14-16 Feb, pp 123-126, 1997.
- Cambronero, M; Martínez, F; Bódalo, A; Courel, A; Casado, J; Casquero, J.: Kala-azar en la infancia. Revisión de veinte años. *An Esp Pediatr*, 18(1): 28-32, 1983.
- Cañavate, C; Medrano, J; Leal, M; Lissen, E; El Bali, M; Alvar, J.: The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV-1. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 109, Istanbul, 1997.
- Cardeñosa, N; Riera, C; Cortés, P; March, F; Muñoz, C; Portús, M; Prats, G.: Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic *Leishmania infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 17: 509-516, 1995.
- Cardoso, L; Neto, F; Rodrigues, M; Cabral, M.: Use of skin test in the detection of *Leishmania* canine infection: study of the method and results from a survey in an endemic region of visceral leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 100, Istanbul, 1997.
- Carrasco de la Peña, JL.: En: *El Método Estadístico en la Investigación Médica*. Ed. por Carrasco de la Peña. Editorial Karpos S.A., Madrid, 1982.
- Carrera, L; Balaña-Fouce, R; Alunda, JM.: Polyamine content and drug sensitivities of different clonal lines of *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasitol Res*, 80: 203-207, 1994.
- Carrera, L; Fermín, ML; Tesouro, M; Garcia, P; Rollán, E; González, JL; Méndez, S; Cuquerella, M; Alunda, JM.: Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp Parasitol*, 82: 139-146, 1996.
- Carter, KC; Dolan, TF; Alexander, J; Baillie, J; Mccolgan, C.: Visceral leishmaniasis: drug carrier system characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. *J Pharm Pharmacol*, 41: 87-91, 1989.
- Carter, KC; Mullen, AB; Baillie, AJ.: Treatment with a vesicular formulation of sodium stibogluconate (SGG) and immunity to homologous challenge with *Leishmania donovani*. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 186, Istanbul, 1997.
- Carvalho, EM; Teixeira, RS; Johnson, WDJr.: Cell-mediated immunity in american visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun*, 33(2): 498-502, 1981.
- *Catálogo de Especialidades Farmacéuticas*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, 1996.
- Catania, S; Tzantzoglou, S; Ajassa, C; Catania, N; Berardelli, P; Bellagamba, R; Clerico, A; Mastropietro, C; Paffetti, A.: Considerations about the use of liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of visceral leishmaniasis in pediatric age. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 184, Istanbul, 1997.
- Catarsini, O.: Leishmaniosi del cane: interventi biotipici per la diagnosi microscopica. *Ann Fac Med Vet, Messina*. 87bis(15): 191-200, 1978.
- Catarsini, O.: Leishmaniosi canina. Prognosi e profilassi. Editoriale Grasso, *SCIVAC*, pp. 81-85, 1989.
- Celaya Carrillo, C.: Estudio epidemiológico descriptivo de la leishmaniosis canina en un entorno periurbano de la ciudad de Madrid. Parte I: seroprevalencia. *Veterinaria en Madrid*, 5(23): 13-15, 1993.
- Chakkalath, HR et Titus, RG.: *Leishmania major*-parasitized macrophages augment Th2-type T cell activation. *J Immunol*, 153: 4378-4387, 1994.
- Chang, KP.: Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg*, 30(2): 322-333, 1981.

- Chapman, WL; Hanson, WL; Waits, VB; Kinnamon, KE.: Antileishmanial activity of selected compounds in dogs experimentally infected with *Leishmania donovani*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 21(4): 189-193, 1979.
- Chapman, WL; Hanson, WL; Alving, CR; Hendricks, LD.: Antileishmanial activity of liposome encapsulated meglumine antimoniate in the dog. *Amer J Vet Res*, 45(5): 1028-1030, 1984.
- Charley, B et Blecha, F.: Les cytokines: leur rôle dans la régulation du système immunitaire, leur utilisation potentielle chez l'animal. *Point Veterinaire*, 23(139): 71-77, 1991.
- Chew, DJ.: Fluid therapy during intrinsic renal failure. En: *Fluid Therapy in Small Animal Practice (chapter 23)*, pp. 554-572. Ed. by DiBartola. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1992.
- Cher, DJ et Mosmann, TR.: Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *J Immunol*, 138: 3688-3694, 1987.
- Cherwinski, HM; Schumacher, JH; Brown, KD; Mosmann, TR.: Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J Exp Med*, 166: 1229-1244, 1987.
- Chiacchio, SB.: Técnicas inmunológicas en el diagnóstico de la leishmaniosis canina y su estudio comparativo (ID, CIEP, IFI) (*Tesis doctoral*). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1985.
- Chulay, JD; Bhatt, SM; Muigai, R; Ho, M; Gachihí, G; Were, JBO; Chunge, C; Bryceson, ADM.: A comparison of three dosage regimens of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *J Infect Dis*, 148(1): 148-155, 1983.
- Chulay, JD; Fleckenstein, L; Smith, DH.: Pharmacokinetics of antimony drug treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82: 69-72, 1988.
- Chunge, CN; Gachihí, G; Muigai, R; Wasunna, A; Rashid, JR; Chulay, JD; Anabwani, G; Oster, CN; Bryceson DM.: Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs III. Successful treatment using a combination of sodium stibogluconate plus allopurinol. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79: 715-718, 1985.
- Coffman, RL; Seymour, BWP; Lebnan, DA; Hiraki, DD; Christiansen, JA; Shrader, B; Cherwinski, HM; Savelkoul, HFJ; Finkelman, FD; Bond, MW; Mosmann, TR.: The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev*, 102: 5-28, 1988.
- Coles, EH.: Liver function. En: *Veterinary Clinical Pathology, 4th Ed. (chapter 7)*, pp. 129-151. Ed. by Embert H. Coles. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19105, 1986.
- *Compendium of drug therapy*. CORE Publishing Division of Excerpta Medica, Inc., Lawrenceville, NJ 08648, 1991/1992.
- Consejería Económica. Departamento de Estadística.: Enfermedades de declaración obligatoria. Casos registrados. *Anuario estadístico. Volumen I. Comunidad de Madrid*, 1993.
- Cornelius, CE.: Liver function. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 4th Edition (Chapter 14)*, pp. 364-397. Ed. by Kaneko. Academic Press, San Diego, California 92101, 1989.
- Courtney, CH et Roberson EL.: Antinematodal drugs. En: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 7th Ed. (chapter 45)*, pp. 885-932. Ed. by Richard Adams. Iowa State University Press, Ames, Iowa 50014, 1995.
- Cox, FEG et Liew, FY.: T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Paras Today*, 8(11): 371-374, 1992.
- Crende Casanegra, FJ; Llull Bauzá, S; Llull Grimalt, J; Moragues Lladonet, M.: Alternativa al tratamiento clásico de la leishmaniosis mediante el uso de terapia oral. *Premios Fundación Purina*, pp. 57-68, 1992.
- Croft, SL.: Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. *TIPS*, 9: 376-381, 1988.
- Croft, SL; Davidson, RN; Thornton, EA.: Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemoth*, 28, suppl B: 111-118, 1991.

- Cunha, FQ; Moncada, S; Liew, FY.: Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Comm*, 182(3): 1155-59, 1992.
- D'Ambrosio, G; Agresti, A; Gallo, C.: Trattamento della leishmaniosi del cane. Impiego di un nuovo derivato dell'imidazolo. *Obiett Docum Veter*, 8: 3, pp. 31-34, 1987.
- Das Gupta, S; Ghosh, DK; Majumder, HK.: A cloned Kinetoplast DNA mini-circle fragment from a *Leishmania* spp. specific for post-kala-azar dermal leishmaniasis strains. *Parasitol*, 102: 187-191, 1991.
- Davidson, RN; di Martino, L; Gradoni, L; Giacchino, R; Russo, R; Gaeta, GB; Pempinello, R; Scott, S; Raimondi, F; Cascio, A; Prestileo, T; Caldeira, L; Wilkinson, RJ; Bryceson, AD.: Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Quarter J Med*, 87: 75-81, 1994.
- Davidson, RN; di Martino, L; Gradoni, L; Giacchino, R; Gaeta, GB; Pempinello, R; Scott, S; Cascio, A; Castagnola, E; Maisto, A; Gramiccia, M; di Caprio, D; Wilkinson, RJ; Bryceson, AD.: Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clin Infect Dis*, 22: 938-943, 1996.
- Davis, LE.: Dosis usuales de los fármacos mencionados en el texto. En: *Manual de Terapéutica de los pequeños animales*, pp. 689-700. Ed. by Davis, LE. SALVAT, Barcelona, 1987.
- Dedet, JP; Pratlong, F.: *Leishmania* identification. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 120, Istanbul, 1997.
- Delgado, J.(comunicación oral): Mesa redonda sobre la situación actual de la leishmaniosis canina. AMVAC, 28 May, 1994.
- Dellamonica, P; Bernard, E; Le Fichoux, Y; Politano, S; Carles, M; Durand, J; Mondain, V.: Allopurinol for treatment of visceral leishmaniasis in patients with AIDS. *J Infect Dis*, 160(5): 904-905, 1989.
- Denerolle, Ph.: Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 31: 137-145, 1996.
- Deplazes, P; Smith, NC; Arnold, P; Lutz, H; Eckert, J.: Specific Ig G1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunology*, 17: 451-458, 1995.
- Dogra, J.: Leishmaniasis therapy.: Oral itraconazole versus intralesional berberine in cutaneous form. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 179, Istanbul, 1997.
- Dorfman, M et Dimski, DS.: Paraproteinemias in small animal medicine. *Comp Cont Educ Art #6*, 14(5): 621-630, 1992.
- Dow, SW et Lappin, MR.: Immunopathologic consequences of infectious disease. En: *Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*, pp. 267-271. Ed. by Bonagura & Kirk, RW. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1995.
- Dunan, S.: Interprétation des résultats biologiques dans les leishmanioses humaines et canines. *Rec Méd Vét*, 154(3): 251-261, 1978.
- Dupond, JL; Chobaut, JC; Barale, T; Billerey, C; Mallet, H; Pretot, L; Leconte des Floris, R.: Leishmaniose laryngée chez un Jurassien. Cause insolite de granulomatose éphithélioïde et giganto-cellulaire. *Press Med*, 13(3): 149-151, 1984.
- Dye, C; Vidor, E; Dereure, J.: Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect*, 103: 647-656, 1993.
- Dye, C.: The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*, 55(2): 125-130, 1996.
- El Hassan, AM; Ghalib, HW; Zijlstra, EE; Eltoun, IA; Satti, M; Ali, MS; Ali, HMA.: Post kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: clinical features, pathology and treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86: 245-248, 1992.

- Epheros, M; Bitnun, A; Waldman, E; Zilberstein, D.: Characterization of stage-specific responses of *L. donovani* to meglumine antimoniate. *First World ongress on Leishmaniasis*, pp. 180, Istanbul, 1997.
- Eslami, Z; Gaucher, D; Tanner, CE.: Synergism of IL-2-stimulated splenocytes and Pentostam® enhances the killing of *Leishmania donovani* in vitro. *Clin Immunol Immunopathol*, 81(1): 74-81, 1996.
- Euzeby, J.: Thérapeutique de la leishmaniose générale du chien. Actualité - Perspectives. *Rev Méd Vét*, 133(6): 383-390, 1982.
- Euzeby, J.: Thérapeutique actuelle et nouveaux concepts. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23: Suppl 5, pp. 103-110, 1988.
- Fairlamb, AH.: Metabolism and functions of trypanothione with special reference to leishmaniasis. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Science, vol. 163), pp., 487-494. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Faraut-Gambarelli, F; Piarroux, R; Deniau, M; Giusiano, B; Marty, P; Michel, M; Faugere, B; Dumon, H.: *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 188, Istanbul, 1997.
- Federico, G; Tacconelli, E; Tumbarello, M; Ventura, G; Froio, N; Cauda, R.: Prognostic indicators of visceral leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 108, Istanbul, 1997.
- Ferguson, DC et Hoening, M.: Glucocorticoids, mineralocorticoids and steroid synthesis inhibitors. En: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 7th Ed. (chapter 32), pp. 622-643. Ed. by Richard Adams. Iowa State University Press, Ames, Iowa 50014, 1995.
- Ferrer, L; Rabanal, RM; Domingo, M; Ramos, JA; Fondevila, D.: Identification of *Leishmania donovani*, amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*, 44: 194-196, 1988a.
- Ferrer, L; Rabanal, R; Fondevila, D; Ramos, JA; Domingo, M.: Skin lesions in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 29:381-388, 1988b.
- Ferrer, L; Fondevila, D; Marco, A; Pumarola, M.: Atypical nodular leishmaniasis in two dogs. *Vet Record*, 126: 90, 1990.
- Ferrer, L; Juanola, B; Ramos, JA; Ramis, A.: Chronic colitis due to leishmania infection in two dogs. *Vet Pat*, 28(4): 342-343, 1991.
- Ferrer, L.: Leishmaniasis. En: *Kirk's Current Veterinary Therapy XI. Small Animal Practice*, pp. 266-270. Ed. by Kirk et Bonagura. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1992.
- Ferrer, L; Aisa, MJ; Roura, X; Portús, M.: Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Record*, 136: 514-516, 1995.
- Ferrer, L.: Leishmaniosis. *XIV Jornadas Anuales AMVAC*, pp 99-111, 14-16/Feb, Madrid, 1997a.
- Ferrer, L.: Leishmaniosis: update in diagnosis and therapy. *14th Annual Congress on ESVD-ECVD*, pp. 33-36, 5-7/Sep, Pisa, 1997b.
- Fiorentino, DF; Bond, MW; Mosmann, TR.: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170: 2081-95, 1989.
- Fisa, R; Gallego, M; Riera, C; Aisa, MJ; Valls, D; Serra, T; Colmenares, M de; Castillejo, S; Portús, M.: Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J Vet Diagn Invest*, 9: 50-55, 1997.
- Font, A; Durall, N; Domingo, M; Closa, JM; Mascort, J; Ferrer, LL.: Cardiac tamponade in a dog with visceral leishmaniasis. *JAAHA*, 29: 95-100, 1993a.
- Font, A; Closa, JM; Molina, A; Mascort, J.: Thrombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 34: 466-470, 1993b.

- Font, A; Gines, C; Closa, JM; Mascort, J.: Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. *JAVMA*, 204(7): 1043-1048, 1994.
- Font, A.: Consider leishmaniasis in differential for monoclonal gammopathies in dogs. *JAVMA*, 208(2): 184, 1996a.
- Font, A; Roura, X; Fondevila, D; Closa, JM; Mascort, J; Ferrer, L.: Canine mucosal leishmaniasis. *JAAHA*, 32: 131-137, 1996b.
- Fournet, A; Gantier, JC; Gautheret, A; Leysalles, L; Munos, MH; Mayrargue, J; Moskowitz, H; Cave, A; Hocquemiller, R.: The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemoth*, 33: 537-544, 1994.
- Fowles, RE; Fajardo, IM; Leibowitch, JL; David, JR.: The enhancement of macrophage bacteriostasis by products of activated lymphocytes. *J Exp Med*, 138: 952-964, 1973.
- Franc, M.: La leishmaniose canine. *Rec Méd Vét*, 169(5/6): 433-437, 1993.
- Franco, MA; Barbosa, AC; Rath, S; Dorea, JG.: Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. *Am J Trop Med Hyg*, 52(5): 435-437, 1995.
- Frankenburg, S; Jonas, F; Gross, A; Klaus, S.: Development of *in vitro* parameters of cell-mediated immunity in the course of human cutaneous leishmaniasis infection. *Am J Trop Med Hyg*, 48(4): 512-518, 1993.
- Frankenburg, S; Axelrod, O; Kutner, S; Greenblatt, CL; Klaus, SN; Pirak, EA; McMaster, R; Lowell, GH.: Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using an intrinsically adjuvanted synthetic lipopeptide vaccine. *Vaccine*, 14(9): 923-929, 1996.
- Freitas, E; Martins, LO; Souza, LAF; Melo, MN; Michalick, MSM.: Potential transmission of the visceral leishmaniasis by blood transfusion in veterinary medicine. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 148, Istanbul, 1997.
- Fuéri, C; Faraut-Gambarelli, F; Dumon, H.: Presence of multidrug resistance gene in *Leishmania infantum*: it's role in resistance to meglumine. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 187, Istanbul, 1997.
- Gallerano, RH; Marr, JJ; Sosa, RR.: Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 43(2): 159-166, 1990.
- Gangneux, JP; Sulahian, A; Garin, YJF; Farinotti, R; Derouin, F.: Therapy of visceral leishmaniasis due to *L. infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob Agents Chemoth*, 40(5): 1214-1218, 1996.
- García Alonso, M.: Análisis de la antigüedad de *Leishmania infantum* en infecciones caninas naturales: estudio de un foco endémico. (*Tesis doctoral*). Departamento de Medicina y Sanidad Animal, Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Cáceres, 1994.
- García Palencia, P.: Patología intestinal en la leishmaniosis experimental canina (*Tesis doctoral*). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1996.
- García-Verdugo Roncero, MJ.: Análisis de la respuesta inmune humoral en leishmaniosis canina: repercusiones inmunopatológicas. (*Tesis doctoral*). Departamento de Medicina y Sanidad Animal, Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Cáceres, 1996.
- Garifallou, A; Schnur, LF; Stratigos, JD; Hadziandoniou, M; Savigos, M; Stavrianeas, N; Sérié, C.: Leishmaniasis in Greece II. *Ann Trop Med Parasitol*, 78(4): 369-375, 1984.
- Gascón, FM.: Leishmaniosis canina: aspectos pronósticos y terapéuticos. *Congreso Nacional de AVEPA*, pp. 171-176, 14-16 Octubre, Barcelona, 1994.
- Gasim, S; El Hassan, A; Khalil, E; Ismail, A; Kadaru, A; Kharazmi, A; Theander, TG.: IL-10 is a key molecule in the pathogenesis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 15, Istanbul, 1997.

- Gasser Jr, RA; Magill, AJ; Oster, CN; Franke, ED; Grögl, M; Berman, JD.: Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 18: 83-90, 1994.
- Giauffret, A et Taliercio, YP.: Mise es évidence d'anticorps sériques chez le chien atteint de leishmaniose, par une technique d'immunofluorescence indirect. *Rec Méd Vét*, Tome CXLVII: 141-151, 1971.
- Giauffret, A; Sanchis, R; Vitu, C.: Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. I. Application au diagnostic, au pronostic et au contrôle du traitement dans la maladie naturelle. *Revue Méd Vét*, 127(6): 913-930, 1976.
- Gil Collado, J.: Phlébotomes et leishmanioses en Espagne. Ecologie des leishmanioses. *Colloques Internationaux du CNRS*, 239: 177-189, 1977.
- Gil Collado J; Morillas F; Sanchis MC.: Los flebotomos en España. *Rev San Hig Púb*, 63: 15-34, 1989.
- Ginel, PJ; Lucena, R; Martín, E; Molleda, JM.: Eficacia de la administración periódica de alopurinol en el control de la leishmaniosis canina. *XXXII Congreso Nacional de AVEPA*, p. 320, Sevilla 2/5 Oct, 1997.
- González Aseguiñolaza, G.: Clonación y caracterización de antígenos del parásito *L.infantum* (Tesis doctoral). Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 1996.
- González Romero, V.: Focos enzoóticos de leishmaniosis canina en Madrid. *Cons Gral Coleg Vet España*, 9: 373-385, 1955.
- Gradoni, L; Gramiccia, M; Mancianti, F; Pieri, S.: Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 823:568-571, 1988.
- Gradoni, L; Gramiccia, M.: *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status?. *Parasitol Today*, 10: 264-267, 1994.
- Gradoni, L; Bryceson, A; Desjeux, P.: Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Bull WHO*, 73(2): 191-197, 1995.
- Gramiccia, M; Gradoni, L; Angelici, MC.: Epidemiology of mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*: isoenzyme and kDNA analysis for the identification of parasites from man, vectors and reservoirs. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Science, vol. 163), pp., 21-37. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Gramiccia, M; Gradoni, I; Orsini, S.: Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime®) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Am Trop Med Paras*, 86(6): 613-620, 1992.
- Grauer, GF et Lane IF.: Acute renal failure. En: *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Vol. II, 4th Ed. (chapter 133)*, pp. 1720-1733. Ed. by Ettinger & Feldman, SJ. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1995.
- Grögl, M; Oduola, AM; Cordero, LDC; Kyle, DE.: *Leishmania* spp.: development of Pentostam-resistant clones *in vitro* by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol*, 69: 78-90, 1989.
- Grögl, M; Thomason, TN; Franke, ED.: Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*, 47(1): 117-126, 1992.
- Grondalen, J et Sjerne, E.: Infectious diseases among dogs and cats in Europe. *Europ J Comp An Pract*, 4(1): 16-19, 1994.
- Groulade, P.: Hématologie et biologie cliniques dans la leishmaniose. *Anim Comp*, 2: 121-128, 1977.
- Groulade, P.: L'électrophorèse des protéines sériques dans la leishmaniose canine. *Revue Méd Vét*, 134(12): 701-708, 1983.
- Groulade, P.: L'intérêt de l'électrophorèse des protéines sériques dans le bilan et le suivi au cours de la leishmaniose canine. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 93-101, 1988.

- Guericio, V et Iannizzotto, G.: Variazioni sieroproteiche in cani portatori naturali di leishmanie. *Arch Vet Italiano*, 29(3-4): 96-97, 1978.
- *Guia de Productos zoosanitarios Veterindustria (5ª Ed)*. Veterindustria, Madrid 28010, 1994.
- Guilvard, E; Gallego, M; Moreno, G; Fisa, R; Rispaill, P; Pralong, F; Martínez Ortega, E; Gallego, J; Rioux, JA.: Natural infection of *Phlebotomus ariasi* and *Phlebotomus perniciosus* (Diptere: Psychodidae) in Catalonia (Spain). *Parasite*, 3(2): 191-192, 1996.
- Guy, M; Bailey, W; Snowden, K.: Canine leishmaniasis. *Vet Record*, Apr 10: 396, 1993.
- Haas, P; Ozon, C; Bayada, M.: Expression standardisée des résultats dans la sérologie de la leishmaniose canine. Application a la réaction d'ELISA. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23 (5): 89-92, 1988.
- Haidaris, CG; Bonventre, PF.: Efficacy of combined immunostimulation and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 32: 2, pp. 286-295, 1983.
- Haldar, JP; Saha, KC; Ghose, AC.: Immunological profiles in indian post kala-azar dermal leishmaniasis. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Science, vol. 163), pp. 387-393. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Hanson, WL; Chapman; Kinnamon, KE.: Testing of drugs for antileishmanial activity in golden hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Intern J Parasitol*, 7: 443-447, 1977.
- Hantson, P; Leonard, ED; Crutzen-Fayt, MC; Leonard, A; Vandercam, B; Delaere, B; Mahieu, P.: Cytogenetic observations after meglumine antimoniate therapy for visceral leishmaniasis. *Pharmacotherapy*, 16(5): 869-871, 1996.
- Harris, MP.: Suspected transmission of leishmaniasis. *Vet Record*, Oct 1: 339, 1994.
- Heit, MC et Riviere, JE.: Antifungal and antiviral drugs. En: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 7th Ed. (chapter 44), pp. 855-883. Ed. by Richard Adams. Iowa State University Press, Ames, Iowa 50014, 1995.
- Hervás, J; Méndez, A; Carrasco, L; Gómez Villamandos, JC.: Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Vet Record*, 139(12): 293-295, 1996.
- Hervás, J; Chacón-M, F; Carrasco, L; Gómez- Villamandos, JC.: Leishmaniosis visceral en el gato (*Felis catus domesticus*). *XXXIII Congreso Nacional de AVEPA*, p. 309, Sevilla 2/5 Oct, 1997.
- Herwaldt, B; Berman, JD.: Recommendations for treating leishmaniasis with stibogluconato sódico (Pentostam®) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg*, 46(3): 296-306, 1992a.
- Herwaldt, B; Kaye, ET; Lepore, TJ; Berman, JD; Baden, HP.: Sodium stibogluconate (Pentostam®) overdose during treatment of american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, 165: 5, 968-971, 1992b.
- Hill, JO.: Pathophysiology of experimental leishmaniasis: pattern of development of metastatic disease in the susceptible host. *Infect Immun*, 52(2): 364-369, 1986.
- Ho, M; Leeuwenburg, J; Mbugua, G; Wamachi, A; Voller, A.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 32(5): 943-946, 1983.
- Hockertz, S; Franke, I; Lohmann-Mathies, ML.: Immunotherapy of murine visceral leishmaniasis with murine recombinant interferon-gamma and MIP-PE encapsulated in liposomes. *J Interferon Res*, 11: 177-185, 1991.
- Holbrook, TW; Cook, JA; Parker, BW.: Immunization against *Leishmania donovani*: glucan as an adjuvant with killed promastigotes. *Am J Trop Med Hyg*, 30(4): 762-768, 1981.
- Hsieh, CS; Heimberger, AB; Gold, JS; O'Garra, A; Murphy, KM.: Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in alfabeta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci*, 89:6065-6067, 1992.
- Hughes, HPA.: Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol Today*, 4(12): 340-347, 1988.

- Hunter, CA; Dolan, TF; Coombs, GH; Baillie, AJ.: Vesicular system (niosomes and liposomes) for delivery of sodium stibogluconate in experimental murine visceral leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol*, 40: 161-165, 1988.
- Iskandar, IQ.: Rifampicin in cutaneous leishmaniasis. *J Int Med Res*, 6: 280-285, 1978.
- Ismail, A; El Hassan, AM; Gasim, S; Kharazmi, A; Theander, TG.: Immune responses of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 14, Istanbul, 1997.
- Iwobi, MU; Doenhoff, MJ; Neal, RA.: Immune-dependence of chemotherapy of experimental visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85:56-57, 1991.
- Izri, MA; Deniau, M; Briere, C; Rivollet, D; Petithory, JC; Houin, R; Rousset, JJ.: Leishmaniasis in AIDS patients: results of leukocytoconcentration, a fast biological method of diagnosis. *Bull World Health Organ*, 74(1): 91-93, 1996.
- Jiménez, M; Ferrer-Dufol, M; Cañavate, C; Gutiérrez-Solar, B; Molina, R; Laguna, F; López-Vélez, R; Cercenado, E; Daudén, E; Blázquez, J; Ladrón de Guevara, C; Gómez, J; Torre, J; Barros, C; Altés, J; Serra, T; Alvar, J.: Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol letters*, 131: 197-204, 1995.
- Jiménez Mazzucchelli, F.: Leishmaniosis canina. Diagnóstico inmunológico. Adaptación y valoración del ELISA indirecto. (Tesis doctoral). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1987.
- Jüttner Culebras, C.: Adaptación de un método para el estudio *in vitro* de la funcionalidad plaquetaria en sangre completa; aplicación para el estudio de la hemostasia en la leishmaniosis canina (Tesis doctoral). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1996.
- Kaar, S; Kar, K; Bhattacharya, PK; Ghosh, DK.: Experimental visceral leishmaniasis: role of *trans*-aconitic acid in combined chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemoth*, 37(11): 2459-2465, 1993.
- Kager, PA; Rees, PH; Welde, PT; Hockmeyer, WT; Lyerly, WH.: Allopurinol in the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans the R Soc Trop Med Hyg*, 75(4): 556-559, 1981.
- Kaneko, JJ.: Serum Proteins and the Dysproteinemias. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4th Edition (Chapter 6), pp. 142-165. Ed. by Kaneko. Academic Press, San Diego, California 92101, 1989.
- Kaplanski, G; Buscaylet, C; Penot-Ragon, C; Durand, JM; Soubeyrand, J.: Antimony/interferon-gamma combination in the treatment of visceral leishmaniasis in AIDS. *AIDS*, 10(10): 1172-74, 1996.
- Kaye, PM *et* Blackwell, JM.: *Lsh*, antigen presentation and the development of CMI. *Res Immunol*, 140(8): 810-815, 1989.
- Keenan, CM; Hendricks, LD; Lightner, L; Webster, HK; Johnson, AJ.: Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. Infection, clinical disease and clinical pathology. *Vet Pathol*, 21: 74-79, 1984.
- Keithly, JS *et* Fairlamb, AH.: Inhibition of *Leishmania species* by α -Difluoromethylornithina. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Sciences, vol. 163), pp., 746-764. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Kemp, M.: Immune responses in Old World cutaneous and visceral leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 13, Istanbul, 1997.
- Kharazmi, A; Sorensen, AL; Nielsen, H.: The role of membrane-stabilizing drugs on leishmania parasites by human macrophages. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Sciences, vol. 163), pp., 441-448. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Kiderlen, AF; Lohmann-Matthes, ML.: Treatment of experimental cutaneous and visceral murine leishmaniasis with recombinant gamma-interferon. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Sciences, vol. 163), pp., 457-466. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.

- Killick-Kendrick, R.: Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*, 4: 1-24, 1990.
- Killick-Kendrick, R; Killick-Kendrick, M; Pinelli, E; del Real, G; Molina, R; Vitutia, MM; Cañavate, MC; Nieto, J.: A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, 1: 311-318, 1994.
- Killick-Kendrick, R; Killick-Kendrick, M.: A new tool for the control of canine leishmaniasis: deltamethrin dog collars for longterm protection from sandfly bites. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 159, Istanbul, 1997.
- Kinnamon, KE; Steck, EA; Loizeaux, PS; Hanson, WL; Chapman, WL Jr; Waits, WB.: Antileishmanial activity of lepidines. *Am J Trop Med Hyg*, 27(4): 751-757, 1978.
- Kinnamon, KE; Loizeaux, PS; Waits, WB; Steck, EA; Hendricks, LD; Chapman, WL Jr; Hanson, WL.: Leishmaniasis: Military significance and new hope for treatment. *Military Med*, 144: 660-664, 1979.
- Kinnamon, KE; Steck, EA; Loizeaux, PS; Chapman, WL Jr; Waits, VB; Hanson.: Leishmaniasis: in search of new chemotherapeutic agents. *An J Vet Med*, 41(3): 405-407, 1980.
- Kontos, VI et Spais, AG.: The incidence of canine leishmaniasis in northern Greece: an epizootiological study of the decade 1977-1987. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Sciences, vol. 163), pp., 77-82. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Kontos, VJ et Koutinas, AF.: Old world canine leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education Article #4*, 15(7): 949-958, 1993.
- Koutinas, AF; Kontos, V; Kaldrimidou, H; Lekkas, S.: Canine leishmaniasis-associated nephropathy: a clinical, clinicopathologic and pathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. *Europ J Comp Anim Pract*, V(2): 31-38, 1995.
- Kreutzer, RD; Semko, ME; Hendricks, LD; Wright, N.: Identification of *Leishmania* spp. by multiple isozyme analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 32(4): 703-713, 1983.
- Kreuter, J.: Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. *Infection*, 19: 224-228, 1991.
- Kruth, SA.: Cytokines and biological response modifiers in small animal practice. En: *Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*, pp. 547-554. Ed. by Kirk & Bonagura. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1995.
- Kuhlencord, A; Maniera, T; Eibl, H; Unger, C.: Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 36(8): 1630-1634, 1992.
- Lagardere, B; Chevallier, B; Cheriet, R.: Le kala-azar. *Ann Pédiatr (Paris)*, 39(3): 159-164, 1992.
- Lamothe, J.: Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotéricine B (39 cas). *Prat Méd Chir Anim Comp*, 32: 133-141, 1997a.
- Lamothe, J.: An illustration of the unusual clinical conditions of canine leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 103, Istanbul, 1997b.
- Lanotte, G; Rioux, JA; Croset, H; Vollhardt, Y.: Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 7. Dépistage de l'enzootie canine par les méthodes immunosérologiques. *Ann Paras*, 49(1): 41-62, 1974.
- Lanotte, G; Rioux, JA; Croset, H; Vollhardt, Y.: Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 9. Les méthodes d'échantillonnage dans le dépistage et l'analyse de l'enzootie canine. *Ann Paras Hum Comp*, 53(1): 33-45, 1978.
- Lanotte, G; Rioux, JA; Perieres, J; Vollhardt, Y.: Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann Parasitol*, 54(3): 277-293, 1979.
- Laruelle-Magalon, C et Toga, I.: Un cas de leishmaniose féline. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 31: 255-261, 1996.

- Laugier, C et Verro-Boulanger, C.: Recto-Verso N. 10: Leishmaniose oculaire. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 6: 751-752, 1992.

- Lawrence, F et Robert-Géro, M.: Effects of sinefungin on cellular and biochemical events in promastigotes of *Leishmania d. donovani*. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Science, vol. 163), pp., 479-486. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.

- Leclerc, C.: Suppressor T cells: an appraisal of their role by *in vivo* elimination. *Res Immunol*, 140(3): 318-323, 1989.

- Léonard, A et Gerber, GB.: Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds. *Mutation Res*, 366: 1-8, 1996.

- Lester, SJ et Kenyon, JE.: Use of allopurinol to treat visceral leishmaniasis in a dog. *JAVMA*, 209(3): 615-17, 1996.

- Liew, FY.: Suppressor cell-mediated immunity in infectious diseases. *Res Immunol*, 140(3): 328-333, 1989.

- Liew, FY.: Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 155: 53-64, 1990a.

- Liew, FY, Li, Y, Millot, S.: Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol*, 145(12): 4306-4310, 1990b.

- Liew, FY et O'Donnell, CA.: Immunology of leishmaniasis. *Advan Parasitol*, 32: 161-259, 1993.

- Lindsay, DS et Blagburn BL.: Antiprotozoan drugs. En: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 7th Ed. (chapter 47), pp. 955-983. Ed. by Richard Adams. Iowa State University Press, Ames, Iowa 50014, 1995.

- Liste, F et Gascón, M.: Utilidad de la ferritina sérica como marcador de la evolución clínica en la leishmaniasis canina. XIX Congreso Nacional AVEPA, p. 241, Barcelona 14/16 Oct, 1994.

- Liste, F et Gascón, M.: Demostración de un estado inflamatorio con alteración del perfil hepático en leishmaniasis canina. XIX Congreso Nacional AVEPA, p. 242, Barcelona 14/16 Oct, 1994.

- Liste, F et Gascón, M.: Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Record*, 137: 23-24, 1995.

- Longstaffe, JA; Guy, MW.: Canine leishmaniasis-United Kingdom update. *J Small Anim Pract*, 27(10): 663-671, 1986.

- Looker, DI.; Marr, JJ; Berens, RL.: Mechanisms of action of pyrazolopyrimidines in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, 261: 9412-9415, 1986.

- López, R; Lucena, R; Novales, M; Ginel, PJ; Martín, F; Molleda, JM.: Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *J Vet Med*, 43: 469-474, 1996.

- Lucena, R; Ginel, PJ; López, R; Novales, M; Martín, E; Molleda, JM.: Antinuclear antibodies in dogs with leishmaniasis. *J Vet Med*, 43: 255-259, 1996.

- Maazoun, R; Lanotte, G; Pasteur, N; Rioux, JA; Kennou, MF; Pralong, F.: Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 16. Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cévennes, Côte d'Azur, Corse et Tunisie. *Ann Parasitol (Paris)*, 56(2):131-146, 1981.

- Mancianti, F; Gradoni, L; Gramiccia, M; Pieri, S; Marconcini, A.: Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. *Trop Med Parasit*, 37: 110-112, 1986.

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

- Mancianti, F; Falcone, ML; Giannelli, C; Poli, A.: Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 59: 13-21, 1995a.
- Mancianti, F et Sozzi, S.: Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89: 402, 1995b.
- Mancianti, F; Pedonese, F; Poli, A.: Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol*, 65(1-2): 1-9, 1996.
- Mansueto, S; Picone, D; La Cascia, C; Di Rosa, S.: La contraimmuno-electroforesi (CIEP) su membrana di acetato di cellulosa (cellogel) nella diagnosi della leishmaniosi viscerale. *Ann Sclavo*, 21(1): 93-99, 1979.
- Marín Inesta, F; Marín Inesta, E; Martín Luengo, F.: Papel de perros y zorros como reservorios de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Rev Ibér Parasitol*, 42(3): 307-313, 1982.
- Marinkelle, CJ et Rodríguez, EP.: Progresos en la leishmaniosis. *Tribuna Médica*, 746: 1-6, 1981.
- Maroli, M et Lane, RP.: The effect of permethrin impregnated nets on *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) in Central Italy. En: *Leishmaniasis. The current status and new strategies for control*. (NATO ASI Series, Series A: Life Sciences, vol. 163), pp., 217-223. Ed. by Hart, DT. Plenum Press, New York, NY 10013, 1989.
- Marr, JJ et Berens, RL.: Antileishmanial effect of allopurinol. II. Relationship of adenine metabolism in *Leishmania* species to the action of allopurinol. *J Infect Dis*, 136(6): 724-732, 1977.
- Marsden, D.: Intrarectal Glucantime®. *Rev Soc Bras Med Trop*, 29(3): 295, 1996.
- Martín, J; Martín, F; Puerta, C; López, MC: Nueva generación de vacunas antiparasitarias. En: *Parasitología Molecular, 1ª Ed. (capítulo 14)*, pp. 303-324. Ed. por Rivas y López. CSIC, Madrid 28006, 1993.
- Martín Otero, LE.: Relación de valores comparativos de las técnicas ELISA indirecto e inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la leishmaniosis canina. *Veterinaria en Madrid*, 8(35): 32-35, 1996.
- Martínez, R; García, JD; Gutiérrez, J; Riopérez, E; Valdivieso, L; Alonso, F.: Leishmaniasis visceral en pacientes adictos a drogas por vía parenteral, VIH positivos. *Med Clin (Barc)*, 88: 509-511, 1987.
- Martínez Moreno, A; Martínez Cruz, MS; Blanco, A; Hernández Rodríguez, S.: Immunological and histological study of T and B lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Veter Parasitol*, 51: 49-59, 1993.
- Martínez Moreno, A; Moreno, T; Martínez Moreno, FJ; Acosta, I; Hernández, S.: Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 48: 209-220, 1995.
- Martínez Sallés, J; Lloret Roca, A.: Leishmaniosis canina: Un estudio retrospectivo. *Premios Fundación Purina*, pp. 71-88, 1992.
- Marty, P et Le Fichoux, Y.: Epidémiologie de la leishmaniose dans le sud de la France. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 11-15, 1988.
- Marty, P, Le Fichoux, Y; Giordana, D; Brugnetti, A.: Leishmanin reaction in the human population of a highly endemic focus of canine leishmaniasis in Alpes- Maritimes, France. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86: 249-250, 1992.
- Mary, C; Lamouroux, D; Dunan, S; Quilici, M.: Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-KD and 16-KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am J Trop Med Hyg*, 47(6): 764-771, 1992.
- Mary, C; Ange, G; Dunan, S; Lamouroux, D; Quilici, M.: Characterization of a circulating antigen involved in immune complexes in visceral leishmaniasis patients. *Am J Trop Med Hyg*, 49(4): 492-501, 1993.

- Mattner, F; Magram, J; Ferrante, J; Launois, P; Di Padova, K; Behim, R; Gately, MK; Louis, JA; Alber, G.: Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol*, 26(7): 1553-1559, 1996.
- Mattock, NM et Peters, W.: The experimental chemotherapy of leishmaniasis. II. The activity in tissue culture of some antiparasitic and antimicrobial compounds in clinical use. *Ann Trop Med Parasit*, 69: 359-71, 1975.
- Mattot, M; Ninane, J; Bigaignon, G; Vermylen, C; Cornu, G.: Visceral and cutaneous leishmaniasis in an european pediatric population. *Acta Clin Belg*, 47: 4, pp. 231-237, 1992.
- McBride, M; Linney, M; Claydon, EJ; Weber, J.: Visceral leishmaniasis following treatment with liposomal anfotericin B. *Clin Infect Dis*, 19: 362, 1994.
- McMahon-Pratt, D; Rodríguez, D; Rodríguez, JR; Zhang, Y; Manson, K; Bergman, C; Rivas, L; Rodríguez, JF; Lohman, KL; Ruddle, NH; Esteban, M.: Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun*, 61(8): 3351-3359, 1993.
- Meana, A; Rupérez, C; López Suárez, P; Miró, G.: Estudio epidemiológico de las parasitosis de perros abandonados en la provincia de Madrid. Datos preliminares I. Protozoosis. *Acta Parasitol Portuguesa*, 1(2): 212, 1993.
- Meinecke, CK; Schottelius, J; Oskam, L; Fleischer, B.: Subclinically infected mothers can serve as a reservoir for congenital transmission of visceral leishmaniasis: first case report and review of the literature. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 155, Istanbul, 1997.
- Melby, PC et Sacks, DL.: Analysis of the heterogeneity of T cell responses in human leishmaniasis. *Ann Inst Pasteur/Immunol*, 138(5): 768-771, 1987.
- Méndez Sierra, S.: Metaciclologénesis en *Leishmania infantum*: identificación y caracterización del estadio infectante, desarrollo de un modelo de infección *in vitro* y aplicación al cribado farmacológico (Tesis doctoral). Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1997.
- Mendoza, L; Podetti, M; Chavez, F; Zeledón, R.: Visceral leishmaniasis in a dog introduced into Costa Rica. *R Soc Trop Med Hyg*, 77(2): 283-284, 1983.
- Mesejo, A; Núñez, C; Liombart, A; Pérez, PL; Simó, M; Ruiz, F; Blanquer, J.: Leishmaniasis visceral y fracaso multiorgánico. *Enferm Infecc Microbiol Clín*, 10: 555-558, 1993.
- Miles, MA.: Identificación bioquímica de las leishmanias. *Bol Of Sanit Panam*, 101(3): 217-229, 1986.
- Millesimo, M; Zucca, M; Caramello, P; Svoia, D. Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 26(1): 7-11, 1996.
- Millin, J; Fine, JM; Groulade, J; Groulade, P.: Leishmaniose et dysglobulinemie chez un chien. *Revue Méd Vét*, 126(12): 1655-1664, 1975.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Salud Pública.: Leishmaniasis. Puesta al día. (y II). *Boletín Epidemiológico Semanal. Vigilancia Epidemiológica*, 1742: 161-168, 1986.
- Mishra, M; Biswas, UK; Jha, DN; Khan, AB.: Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. *Lancet*, 340(21): 1256-1257, 1992.
- Mishra, M; Biswas, UK; Jha, AM; Khan, AB.: Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. *Lancet*, 344: 1599-1600, 1994.
- Mitchell, GF; Handman, E; Moll, H; McConville, MJ; Spithill, TW; Kidane, GZ; Sammars, N; Elhay, MJ.: Resistance and susceptibility of mice to *Leishmania major*: a view from Melbourne. *Ann Inst Pasteur/Immunol*, 138(5): 738-743, 1987.
- Molina, R; Amela, C; Nieto, J; San Andrés, M; González, F; Castillo, JA; Lucientes, J; Alvar, J.: Infectivity of dogs naturally infected with *L. infantum* to colonized *P. perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88: 491-493, 1994a.

- Molina, R; Cañavate, C; Cercenado, E; Laguna, F; López-Vélez R; Alvar, J.: Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *P. perniciosus*. *AIDS*, 8:277-79, 1994b.
- Molina, R.: *Phlebotomus perniciosus*: aspectos entomológicos prácticos de la leishmaniosis canina. *Curso de Enfermedades Vectoriales*, pp. 5-12, 23-24/Sep, Madrid, 1995.
- Moll, H.: Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today*, 14(8): 383-386, 1993.
- Monjour, L; Mille, C; Druilhe, P; Gentilini, M.: Application de l'immuno-electro-diffusion, sur membrane d'acetate de cellulose, au diagnostic de la leishmaniose viscerale humaine et canine. *Ann Soc Belge Med Trop*, 58: 293-300, 1978.
- Morillas, F; Sánchez Rabasco, F; Ocaña, J; Martín-Sánchez, J; Ocaña-Wihelmi, J; Acedo, C; Sanchiz-Marín, MC.: Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog and vector. *Parasitol Res*, 82(6): 569-570, 1996.
- Mosmann, TR; Cherwinski, H; Bond, MW; Giedlin, MA; Coffman, RL.: Two Types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7): 2348-2356, 1986.
- Moss, JT et Wilson, JP.: Current treatment recommendations for leishmaniasis. *Ann Pharmac*, 26: 1452-1455, 1992.
- Mullen, A; Baillie, AJ; O'Grady, Carter, KC.: Comparison of the efficacy of a non-ionic surfactant vesicular formulation of sodium stibogluconate (SSG) in a hamster model of leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 186, Istanbul, 1997.
- Murray, HW; Masur, H; Keithly, JS.: Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *J Immunol*, 129(1): 344-350, 1982.
- Murray, HW; Berman, JD; Wright, SD.: Immunochemotherapy for intracellular *Leishmania donovani* infection: interferon-gamma plus pentavalent antimony. *J Infect Dis*, 157(5): 973-978, 1988.
- Murray, HW; Granger, AM; Mohanty, SK.: Response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis: T cell dependent but interferon-gamma and interleukin-2 independent. *J Infect Dis*, 163:622-624, 1991.
- Murray, HW; Hariprasad, J; Fichtl, RE.: Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell-deficient host: Response to amphotericin B and pentamidine. *Antimicrob Agents Chemoth*, 37(7): 1504-1505, 1993.
- Murray, HW; Cervia, JS; Hariprasad, J; Taylor, AP; Stoeckie, Y; Hockman, H.: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*, 95: 1183-1192, 1995.
- Nabors, GS et Farrell, JP.: Successful chemotherapy in experimental leishmaniasis is influenced by the polarity of the T cell response before treatment. *J Infect Dis*, 173: 979-986, 1996.
- Nacy, CA; Nelson, BJ; Meltzer, MS; Green, SJ.: Cytokines that regulate macrophage production of nitrogen oxides and expression of antileishmanial activities. *Res Immunol*, 142: 573-576, 1991.
- Nash, AS.: Canine leishmaniasis. *Vet Record*, 6: 255, 1993.
- Naskidachvili, L et Peroux, F.: La pathologie rénale chez le chien leishmanien. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 43-47, 1988.
- Neal, RA; Allen, S; McCoy, N; Olliaro, P; Croft, SL.: The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother*, 35: 577-584, 1995.

- Nègre, E; Chance, ML; Hanboula, SY; Monsigny, M; Roche, AC; Mayer, RM; Hommel, M.: Antileishmanial drug targeting through glycosylated polymers specifically internalized by macrophage membrane lectins. *Antimicrob Agents Chemother*, 36(10): 2228-2232, 1992.

- Nelson, RW; Couto, CG; Bunch, SE; Grauer, GF; Hawkins, EC; Johnson, CA; Meric, SM; Ware, WA; Willard, M.: Renal failure. En: *Essentials of Small Animal Internal Medicine (chapter 43)*, pp. 481-493. Ed. by Nelson & Couto. Mosby Year Book, St. Louis, Missouri 63146, 1992.

- Nelson, DJ; Bugge, CJL; Elion, GB.: Metabolism of Pyrazolo(3,4-d)pyrimidines in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, 254(10): 3959-3964, 1979a.

- Nelson, DJ; LaFon, SW; Tuttle, JV; Miller, WH; Miller, RL; Krenitsky, TA; Elion, GB.: Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. *J Biol Chem*, 254(22): 11544-11549, 1979b.

- Neogy, AB; Vouldoukis, I; Silva, OA; Tselentis, Y; Lascombe, JC; Segalen, T; Rzepka, D; Monjour, L.: Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 47(6): 772-777, 1992.

- Neogy, AB; Vouldoukis, I; Costa, JM; Monjour, L; The Veterinary Group of Lupino.: Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 54: 367-373, 1994.

- Nieto, CG; Vifiuelas, J; Vlanco, A; García Alonso, M; Verdugo, SG; Navarrete, I.: Detction of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. *Vet Record*, 5: 346-347, 1996.

- Núñez-Torrón, J; Amusatogui, I; Sainz, A.: Aspectos clínicos de babesiosis, ehrlichiosis y leishmaniosis caninas. *I Encontros Veterinarios Galegos*, 19-20/Oct, Silleda, 1996.

- Okong'o-Odera, EA; Wamachi, A; Kagai, JM; Kurtzhals, JAL; Githure, JI; Hey, AS; Were, JBO; Koech, DK; Mitema, ES; Kharazmi, A.: Field application of an ELISA using redefined *Leishmania* antigens for the detection of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87: 423-424, 1993.

- OMS.: Las leishmaniasis. Métodos de lucha. Diagnóstico y tratamiento. *OMS*, pp. 105-114, Ginebra, 1984.

- OMS.: *Lucha contra las leishmaniasis. Serie de Informes Técnicos de la OMS No. 793*, Ginebra, 1990.

- OMS.: *Les leishmanioses. La lutte contre les maladies tropicales*, Genève, 1993.

- Ortiz, AI; Alvarez Bujidos, L; Cubría, JC; Ordóñez, D.: Effect of retinol and other retinoids on the growth of *Leishmania donovani infantum* promastigotes. *Med Sci Res*, 19: 249-251, 1991.

- Osman, OF; Oskam, L; El-Hassan, AM; Zijlstra, EE; Kager, PA.: Evaluation of the PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis and post- kala-azar dermal leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 90, Istanbul, 1997.

- Ozon, C; Marty, P; Veyssière, C; Haas, P; Le Fichoux, Y.: Résultats d'une enquête sur la leishmaniose canine effectuée pendant une courte période chez les vétérinaires praticiens des Alpes-Maritimes. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 30: 199-201, 1995.

- Pal, AR; Guru, PY; Katiyar, JC.: *Leishmania donovani* in hamster: migration of amastigotes to unusual sites following drug therapy. *Med Sci Res*, 17: 579-581, 1989.

- Pal, A; Gupta, S; Katiyar, JC; Puri, A; Sahai, R; Saxena, RP.: Alterations in the immune response of golden hamsters during the course of *Leishmania donovani* infection and after treatment with sodium stibogluconate. *Serodiagn Immunother Infect Disease*, 7: 115-120, 1995.

- Palmer Pol, A.: En: *Análisis de la Supervivencia*. Documentos del Laboratorio de Psicología Matemática. Ed. por Palmer Pol. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, 1986.

- Palacio, J; Liste, F; Gascón, M.: Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Record*, 137: 567-568, 1995.

- Palacio, J; Liste, F; Gascón, M.: Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Vet Record*, 140: 477-480, 1997.
- Pappas, MG; Hajkowski, R; Diggs, CL; Hockmeyer, WT.: Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *R Soc Trop Med Hyg*, 77(3): 425-426, 1983.
- Papich, MG.: Table of common drugs: approximate dosages. En: *Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*, pp. 1429-1446. Ed. by Kirk & Bonagura. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1995.
- Patterson, RJ; Youmans, GP.: Demonstration in tissue culture of lymphocyte-mediated immunity to tuberculosis. *Infect Immun*, 1(6): 600-603, 1970.
- Pearson, RD; Wheeler, DA; Harrison, RH; Kay, HD.: The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis*, 5(5): 907-927, 1983.
- Pearson, RD; Uydess, IL; Chapman, SW; Steigbigel, RT.: Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann Trop Med Parasitol*, 81(6): 735-739, 1987.
- Pearson, RD et Queiroz Sousa, A.: Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 22: 1-13, 1996.
- Pedersen, NC.: Protozoal infections. Leishmaniasis. En: *Feline Infectious diseases (chapter 58)*, pp. 367-400. Ed. by Pedersen. American Veterinary Publications, Inc., Goleta, CA 93117, 1988.
- Pérez Brea, A; Ruiz Moreno, A; Leal Orozco, A; Escorihuela Esteban, R; Otero Fraguas, M.: Leishmaniasis visceral refractaria al tratamiento: eficacia de anfotericina B. *An Esp Pediatr*, 44(2):161-63, 1996.
- Persechino, A; Oliva, G; Ciaramella, P; De Luna, R; Cortese, L.: Emprego da aminosidina na terapêutica da leishmaniose canina. *Riv Zoot Vet*, 22(1): 11-16, 1994.
- Peschel, C; Huber, C; Aulitzky, WE.: Clinical applications of cytokines. *Presse Med*, 23: 1083-1091, 1994.
- Peters, W.: The search for antileishmanial agents. *Biochemistry of Parasites and Host Parasite Relationships*: 523-535, 1976.
- Peters, W; Trotter, ER; Robinson, BL.: The experimental chemotherapy of leishmaniasis, V. The activity of potential leishmanicides against *L. infantum* LV9 in NMRI mice. *Ann Trop Med Paras*, 74(3): 289-296, 1980.
- Philip, W; Duffus, H.: Inmunidad frente a la infección. En: *Inmunología Clínica Veterinaria*, pp. 141-172. Ed. by Halliwell & Gorman. Acribia S.A, Zaragoza 50086, 1992 (original: Saunders, 1989).
- Piarroux, R; Garnier, JM; Gambarelli, F; Dumon, H; Kaplanski, S; Unal, D.: Résistance de *Leishmania infantum* au Glucantime®: circonstances de survenue et prise en charge thérapeutique. *Arch Pédiatr*, 3: 352-356, 1996.
- Piarroux, R.: Diagnosis of visceral leishmaniasis using polymerase chain reaction: a five year experience of routine diagnosis in Marseilles. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 91, Istanbul, 1997.
- Pinelli, E; Killick-Kendrick, R; Wagenaar, J; Bernadina, W; del Real, G; Ruitenber, J.: Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, 62(1): 229-235, 1994a.
- Pinelli, E; Boog, CJP; Rutten, VPMG; van Dijn, B; Bernadina, W; Ruitenber, EJ.: A canine CD8⁺ cytotoxic T cell line specific for *Leishmania infantum* infected macrophages. *Tissue Antigens*, 43: 189-192, 1994b.
- Pinelli, E; Gonzalo, RM; Boog, CJP; Rutten, VPMG; Gebhard, D; del Real, G; Ruitenber, J.: *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol*, 25: 1594-1600, 1995.
- Pinelli, E.: Protective immune responses against *Leishmania infantum* in dogs. Relevance for vaccine development. Chapter 1: General introduction. (*Tesis doctoral*). Institute of Infectious Diseases and Immunology, Department of Immunology. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 1996a.

- Pinelli, E; Langermans, JAM; van Hoeij, M; Rutten, VPMG; Ruitenber, EJ.: Protective immune responses against *Leishmania infantum* in dogs. Relevance for vaccine developmet. Chapter 5: Nitric oxide production by macrophages as an effector mechanism in canine visceral leishmaniasis. (*Tesis doctoral*). Institute of Infectious Diseases and Immunology, Department of Immunology. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 1996b.
- Pinelli, E; Rutten, VPMG; van Hoeij, M; Moore, PF; Ruitenber, EJ.: Protective immune responses against *Leishmania infantum* in dogs. Relevance for vaccine developmet. Chapter 6: *Leishmania infantum*-infected canine macrophages show changes in expression of surface molecules involved in T cell activation. (*Tesis doctoral*). Institute of Infectious Diseases and Immunology, Department of Immunology. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 1996c.
- Pinelli, E; van der Kaaij, SY; Rutten, VPMG; Ruitenber, JE.: Canine visceral leishmaniasis. Studies on induction of protective immunity. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 17, Istanbul, 1997.
- Pizarro Díaz, M.: Alteraciones anatomopatológicas del testículo y epididimo de perros con leishmaniosis de presentación natural (*Tesis doctoral*). Departamento de histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1986.
- Poli, A; Sozzi, S; Guidi, G; Bandinelli, P; Mancianti, F.: Comparison of aminosidine (paramomycin) and sodium stibogluconate for the treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 71: 263-271, 1997.
- Polzin, DJ; Osborne, CA; Barges, JW; James, KM; Churchill, JA.: Chronic renal failure. En: *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Vol. II, 4th Ed (chapter 134)*, pp. 1735-1760. Ed. by Ettinger & Feldman, SJ. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1995.
- Pospischil, A; Fiebiger, I; Krampitz, HE; Weiland, G.: Experimentelle infektion mit Leishmanien beim hund: klinische, pathologische, parasitologische und serologische befunde. *J Vet Med B*, 34: 288-304, 1987.
- Pratlong, F; Lanotte, G; Dereure, J; Marty, P; Dedet, JP.: Leishmaniasis in the south of France: *Leishmania infantum*, enzymatic polymorphism. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 132, Istanbul, 1997.
- Prats, N et Ferrer, L.: A possible mechanism in the pathogenesis of cutaneous lesions in canine leishmaniasis. *Vet Record*, July 22: 103-104, 1995.
- Prescott, JF; Baggot, JD.: Quimioterapia antivirica. En: *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria*, pp. 331-346. Ed. by Prescott & Baggot. Acribia, 50080 Zaragoza, 1991.
- Pumarola, M; Brevik, L; Badiola, J; Vargas, A; Domingo, M; Ferrer, L.: Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Path*, 105: 279-286, 1991.
- Quiles Mora, J; Garcí de Lomas, J; Sánchez Pedreño, J; Marín Iniesta, F; Rodríguez García, F.: Leishmaniasis. Un problema actual. *Rev San Hig Púb*, 53: 771-807, 1979.
- Quilici, M; Dunan, S; Ranque, J.: L'immuno-fluorescence dans les leishmanioses. *Med Trop*, 28(1): 37-43, 1968.
- Quilici, M; Toga, I; Dunan, S; Dunon, H.: La leishmaniose viscérale humaine. Clinique, diagnostic, traitement. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 23(5): 21-27, 1988.
- Ramesh, V.: Allopurinol therapy in post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Acta Derm Venereol*, 76(4): 328-329, 1996.
- Rassam, MB et Al-Mudhaffar, SA.: Comparative diagnostic study of kala-azar. *Ann Trop Med Paras*, 74(3): 283-287, 1980.
- Reed, SG; Barral-Neto, M; Inverso, JA.: Treatmant of experimental visceral leishmaniasis with lymphokine encapsulated in liposomes. *J Immunol*, 132(6): 3116-3119, 1984.
- Reiter, I; Kretzschmar, A; Boch, J; Krampitz, II.: Zur leishmaniose des hundes. Infektion von beagles mit *Leishmania donovani*. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 98: 40-44, 1985.

- Renoux, G et Renoux, M.: Effet immunostimulant d'un imidothiazole sur l'immunisation des souris par *Brucella abortus*. *C R Acad Sc Paris*, t 272D: 349-350, 1971
- Reusch, C; Reiter, I.: Die importierte hundeishmaniose: erfahrungen zu Klinik, diagnostik und therapie mit Na-stibogluconat (Pentostam®). *Tierärztl Prax*, 15: 305-310, 1987.
- Rhalem, A; Sahibi, H; Lasri, S.: Cell-mediated immune response in treated dogs with pentamidine drug against *Leishmania infantum*. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 43, Istanbul, 1997.
- Ribera, E; Ocaña, I; de Otero, J; Cortés, E; Gasser, I; Pahissa, A.: Prophylaxis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Med*, 100: 496-501, 1996.
- Riera, C et Valladares, JE.: Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today*, 12(10): 412, 1996.
- Riera, C; Valladares, JE; Gallego, M; Aisa, MJ; Castillejo, S; Ribas, N; Fisa, R; Carrio, J; de Colmenares, M; Alberola, J; Arboix, M; Portús, M.: Experimental canine leishmaniasis: clinical and parasitological follow-up after treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 45, Istanbul, 1997.
- Rigal, C; Gastellu, J; Gevrey, J.: Une forme suos-cutanée nodulaire de leishmaniose canine. *Scie Vét Méd Comp*, 85(1): 41-43, 1983.
- Rioux, JA; Albert, JL; Houin, R; Dedet, JP; Lanotte, G.: Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes*). *Ann Parasitol Hum Comp*. 43: 421-428, 1968.
- Rioux, JA; Lanotte, G; Destombes, P; Vollhardt, Y; Croset, H.: Leishmaniose expérimentale du Renard *Vulpes vulpes* (L.). *Rec Méd Vet*, CXLVII: 489-498, 1971.
- Rioux, JA; Killick-Kendrick, R; Leaney, AJ; Young, CJ; Turner, DP; Lanotte, G; Bailly, M.: Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 11. La leishmaniose viscérale canine: succès de la trans mission expérimentale "Chien - Phlébotome - Chien" par la piqûre de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann Parasitol (Paris)*, 54(4): 401-407, 1979.
- Rioux, JA; Lanotte, G; Maazoun, R; Perello, R; Pratloug, F.: *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *C R Acad Sc Paris*, 291:701-703, 1980.
- Rodríguez Sánchez, M; González Arribas, JL; Castaño Rosado, M; Fermín Rodríguez, ML; Díaz Yubero, MA.: Leishmaniosis canina. *AVEPA*, 1(1): 11-18, 1981.
- Rodríguez Sánchez, M; Tesouro Diez, MA; Chiacchio, SB.: Leishmaniosis canina. *Bol Inform Cons Gral Col Vet Esp*, 26: 119-125, 1984.
- Rodríguez Sánchez, M; Tesouro Diez, MA; González Arribas, JL; Jiménez Mazzucchelli, F; Fragió, C.: Leishmaniosis canina. *XIII Congreso Mundial WSAVA*, pp. 262-266, Barcelona 6/9 Oct, 1988.
- Rojas, T et Avila, JL.: American leishmania spp.: fomycin B treatment of cutaneous leishmaniasis in mice. *Parasitol*, 94: 467-474, 1987.
- Rollán Landeras, E.: Estudio anatomopatológico del páncreas en la leishmaniosis natural y experimental canina (*Tesis doctoral*). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1994.
- Rolland, L; Zilberfarb, V; Furtado, A; Gentilini, M.: Identification of a 94-kilodalton antigen on *Leishmania* promastigote forms and its specific recognition in human and canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 16: 599-608, 1994.
- Ross, LA.: Diseases of the kidney, pp. 559-583. En: *Handbook of Small Animal Practice. 2nd Ed (chapter 48)*. Ed. by Morgan, RV. Churchill Livingstone Inc., New York, NY 10011, 1992.

- Rosyckuck, RAW; White, SD.: Sistemic infectious diseases and infestations that cause cutaneous lesions. *Vet Med*, 86: 2, pp. 164-181, 1991.
- Roura, X, Sánchez, A, Ferrer, L.: Follow-up of *Leishmania* infected dogs after treatment using a PCR technique. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 99, Istanbul, 1997.
- Roze, M.: Manifestations oculaires de la leishmaniose canine. *Rec Méd Vét*, 162(1): 19-26, 1986.
- Roze, M.: Manifestations oculaires de la leishmaniose canine: étude sérologique. *Rec Méd Vét*, 166(1): 37-43, 1990.
- Roze, M.: Valeur de l'acide tolfénamique dans le traitement des uvéites leishmaniennes. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 27(3): 307-315, 1992.
- Roze, M et Pagès, JP.: Autour de la leishmaniose. *Prat Méd Chir Anim Comp*, Janvier-Février, 1: 85-94, 1994.
- Roze, M.: Oeil et maladies parasitaires. *Congres APMVEAC*, Estoril 24/26 Mai, 1996.
- Rubin, SI.: Management of fluid and electrolyte disorders. En: *Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice*, pp. 951-955. Ed. by Kirk & Bonagura. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1995.
- Rupérez, C, López-Suárez, P, Alonso, A, Alcántara, P, Simarro, I.: Control serológico frente a: *Coronavirus* (CVC), *Parvovirus* (PVC) y *Leishmania donovani* en una población abierta de perros abandonados. *XXXIX Congreso Nacional de AVEPA*, pp. 251, Barcelona 14/16 Oct, 1994.
- Russell, DG.: Immunity to leishmaniasis: what properties delineate a protective antigen?. *Ann Inst Pasteur/Immunol*, 138(5): 774-781, 1987.
- Russell, DG et Talamas-Rohana, P.: *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol Today*, 10(10): 328-333, 1989.
- Sacks, DL et Perkins, PV.: Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223: 1417-1419, 1984.
- Sadick, MD, Locksley, RM, Tubbs, C, Raff, HV.: Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon-gamma in response to *Leishmania* antigens *in vitro*. *J Immunol*, 136(2): 655-661, 1986.
- Sainz, A, Rodríguez, F, Mayoral, I, Tesouro, MA.: Concurrencia de leishmaniosis y ehrlichiosis canina: descripción de 5 casos. *XXVIII Congreso Nacional de AVEPA*, pp. 305, Sevilla 30 Oct/1 Nov, 1993.
- Sainz Rodríguez, A.: Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb (*Tesis doctoral*). Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1996.
- Sánchez Botija, C.: Leishmaniosis canina. *Trabajos Inst Biol Anim*, 4: 70-87, 1936.
- Sanchis, R, Vitu, C, Giauffret, A.: Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. *Revue Méd Vét*, 127(8-9): 1191-1202, 1976.
- Sarkar, S, Mukherjee, T, Patra, P, Bhaduri, A.: Antileishmanial activity of hamycin: a polyene antibiotic. *Biochem Biophys Res Commun*, 15: 182(1), pp. 86-91, 1992.
- Schaer, M, Meyer, DJ, Young, DG.: A dual infection of *Leishmania donovani* and *Ehrlichia canis* in a dog. *Comp Cont Educ*, 7(7): 531-534, 1985.
- Schaer, M.: Fluid therapy for renal failure. *Vet Clin North Amer*, 19: 2, pp. 347-359, 1989.
- Schmidt, DG et Roberts, LS.: Order Kinetoplastida: trypanosomes and their kin. En: *Foundations of Parasitology*, pp. 56-83. Ed. by Schmidt & Roberts. Times Mirror/Mosby College Publishing, Missouri 63144, 1985.

- Schmur, LF; Chance, ML; Ebert, F; Thomas, SC; Peters, W.: The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann Trop Med Paras*, 75(2): 131-144, 1981.
- Scott, DW; Miller, WH Jr; Griffin, CE.: Viral, rickettsial and protozoal skin diseases. En: *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology 5th Ed (chapter 7)*. pp. 469-483. Ed. by Scott, Miller & Griffin. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1995.
- Seaman, J; Boer, C; Wilkinson, R; de Jong, J; de Wilde, E; Sondorp, E; Davidson, R.: Liposomal anfotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. *Clin Infect Dis*, 21: 188-193, 1995.
- Seder, RA; Paul, WE; Davies, MM; de St Groth, BF.: The presence of interleukin-4 during *in vitro* priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*, 176: 1091-1098, 1992.
- Serra, T; Durán, A; Ramírez, A; Salas, A; Salva, F; Morales, C; Molina, F; Arteaga, E.: Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 108, Istanbul, 1997.
- Servicio de Diagnóstico de Ehrlichiosis canina. *Dpto Pat Anim II*. Facultad de Veterinaria, UCM.
- Sharma, R; Bahl, L; Goel, A; Upadhaya, A; Kaushik, SL; Sharma, RL; Gupta, A.: Congenital kala-azar: a case report. *J Commun Dis*, 28(1): 59-61, 1996.
- Sherwood, JA; Gachihi, GS; Muigai, RK; Skilman, DR; Mugo, M; Rashid, JR; Wasunna, KMA; Were, JBO; Kasili, SK; Mbugua, JM; Kirigi, G; Schaefer, KU; Oster, CN; Fleckenstein, LL; Berman, JD; Brewer, TG; Roberts, TR; Johnson, AJ; Schuster, BG.: Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 19: 1034-1039, 1994.
- Shin, IS; Tanifuji, H; Arata, Y; Morizawa, Y; Nakayama, T; Wataya, Y.: 3'-deoxy-3'-fluorinosine as a potent antileishmanial agent. The metabolism and selective cytotoxic effect of 3'-deoxy-3'-fluorinosine against *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani* *in vitro* and *in vivo*. *Parasitol Res*, 81: 622-626, 1995.
- Sierra Valenti, X.: Leishmaniosis cutáneas. *Jano*, 488: 41-47, 1981.
- Singh, S; Chang, KP; Reed, SG.: Blood transmitted kala-azar. Indian scene. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 158, Istanbul, 1997.
- Sinton, JA.: The successful transmission of cutaneous leishmaniasis by inoculation to man from a natural lesion occurring on a dog in India. *Ind Jour Med Res*, 25(3): 787-789, 1938.
- Skeiky, YAW; Webb, J; Badaro, R; Campos-Neto, A; Reed, SG.: Recombinant leishmanial antigens in vaccine development. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 6, Istanbul, 1997.
- Skoyma-Karez, B.: Ketoconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 180, Istanbul, 1997.
- Slappendel, RJ.: Canine leishmaniasis. A review on 95 cases in the Netherlands. *Vet Quater*, 10(1): 1-17, 1988.
- Slappendel, RJ et Greene, CE.: Leishmaniasis. En: *Infectious diseases of the dog and cat*, pp. 769-777. Ed. by Greene. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1990.
- Smrkovski, LL et Larson, CL.: Effect of treatment with BCG on the course of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect Immun*, 16(1): 249-257, 1977.
- Sorenson, JL et Ling, GV.: Diagnosis, prevention and treatment of urate urolithiasis in Dalmatians. *JAVMA*, 203(6): 863-869, 1993.
- Soto, J; Buffet, P; Grogil, M; Berman, J.: Successful treatment of colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. *Am J Trop Med Hyg*, 50(1): 107-111, 1994.

- Soulsby, FJL.: Phylum: Sarcostigophora Honigberg y Balamuth, 1963. Subphylum: Mastigophora Diesing, 1866. En: *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*, pp. 521-563. Ed. por Soulsby, Interamericana, México, 1987 (original: Billière Tindall, 1982).
- Spreng, D.: Leishmanial polyarthritis in two dogs. *J Small Anim Pract*, 34: 559-563, 1993.
- Squires, KE; Rosenkaimer, F; Sherwood, JA; Forni, AL; Were, JBO; Murray, HW.: Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis. A controlled pilot trial of antimony versus antimony plus interferon-gamma. *Am J Trop Med Hyg*, 48(5): 666-669, 1993.
- Steck, EA.: Host - Protozoa - Drug interactions in targeted chemotherapy. *Host Invader Interplay*, 575-582, 1980.
- Steuber, S; Moritz, A; Greiner, M; Schirrmann, I.: The PCR: diagnostic tool for the pre and post treatment detection of *L. infantum* in dogs. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 98, Istanbul, 1997.
- Stevens, TL; Bossie, A; Sanders, VM; Fernández-Botrán, R; Coffman, RL; Mosmann, TR; Vitetta, ES.: Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*, 334: 255-258, 1988.
- Stosiek, N; Bogdan, C; Solbach, W; Hornstein, OP.: Leishmaniose mit multiplen hauserden. *Dtsch Med Wochenschr*, 13: 117(46), pp. 1752-1756, 1992.
- Strobel, M; Marchand, JP; Dedet, JP.: Le traitement des leishmanioses cutanées de l'Ancien Monde. *Méd Malad Infect*, 9(6): 360-368, 1979.
- Suffia, I; Quaranta, JF; Eulalio, MCM; Ferrua, B; Marty, P; Le Fichoux, Y; Kubar, J.: Humen T-cell activation by 14- and 18-Kilodalton nuclear proteins of *L. infantum*. *Infect Immun*, 63(10): 3765-3771, 1995.
- Sundar, S; Rosenkaimer, F; Murray, HW.: Successful treatment of refractory visceral leishmaniasis in India using antimony plus interferon-gamma. *J Infect Dis*, 170: 659-662, 1994.
- Sundar, S; Horwith, G; Murray, HW.: Cure of antimony-refractory Indian kala-azar with short-course, low-dose intravenous amphotericin B lipid complex (AbLC) therapy. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 177, Istanbul, 1997.
- Swenson, CL; Silverman, J; Stromberg, PC; Johnson, SE; Wilkie, DA; Eaton, KA; Kociba, GJ.: Visceral leishmaniasis in an english foxhound from an Ohio research colony. *JAVMA*, 193(9): 1089-1092, 1988.
- Symmers, WStC.: Leishmaniasis acquired by contagion. A case of marital infection in Britain. *Lancet*, 1: 127-132, 1960.
- Tallab, TM; Bahamdani, KA; Mirdad, S; Johargi, H; Mourad, MM; Ibrahim, K; el Sherbini, AH; Karkashan, E; Khare, AK; Jamal, A.: Cutaneous leishmaniasis: schedules for intralesional treatment with sodium stibogluconate. *Int J Dermatol*, 38(5): 594-597, 1996.
- Tapia Collados, C; Comino Almenara, L; Escribá Tomás, P; Ribera Delgado, M; González Peraba, J; Tapia López, M; López Peña, L.: Kala-azar. ¿Es posible el tratamiento con aminoglicósidos?. *An Esp Pediatr*, 36: 1, pp. 57-58, 1992.
- Tassi, P.: Leishmaniosi canina. Terapia. *SCIVAC*, pp. 73-79, Editoriale Grasso, 1989.
- Tassi, P; Ormas, P; Madonna, M; Carli, S; Belloli, C; de Natale, G; Marcotrigiano, GO.: Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci*, 56: 144-150, 1994.
- Tennant, B.: Drug listings and monographs. En: *Small Animal Formulary 2nd ed*, pp. 6-209. Ed. by Tennant. BSAVA, Gloucestershire GL51 5TQ, 1997.
- Terry, LL; Lewis, JL. Jr; Sessoms, SM.: Laboratory infection with *Leishmania donovani*: a case report. *Am J Trop Med*, 30: 643-649, 1950.

- Tesouro Díez, MA.: Aspectos clínicos y laboratoriales del diagnóstico de la leishmaniosis canina. Estudio epizootológico en la provincia de Madrid (*Tesis doctoral*). Departamento de Patología General y Médica. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 1984a.

- Tesouro Díez, MA; Jiménez Mazzucchelli, F; Rodríguez Sánchez, M.: Leishmaniosis canina: diagnóstico. *Revista AVEPA*, 4(13):47-53, 1984b.

- Tesouro Díez, MA; Jiménez Mazzucchelli, F; Frago Arnold, C; Rodríguez Sánchez, M.: Evolución del número de casos de leishmaniosis canina en Madrid y otras provincias. Años 1981-1988. *Vet Record* (Ed. Española), vol. II: 1, pp. 6-7, 1989.

- Tesouro, MA; Frago, C; Rodríguez, M.: Epizootiological aspects of canine leishmaniasis in Spain. *XXIV Congreso Mundial de Veterinaria*, pp. 318, Río de Janeiro 18-23 Ago, 1991.

- Tesouro, MA; Rodríguez, F; Sáinz, A; Jiménez, F.: Contribuciones al diagnóstico y patocronia de la leishmaniosis canina I. *Información Veterinaria*, 125: 40-46, 1992a.

- Tesouro, MA; Rodríguez, F; Sáinz, A; Jiménez, F.: Contribuciones al diagnóstico y patocronia de la leishmaniosis canina II. *Información Veterinaria*, 127: 34-40, 1992b.

- Tesouro, MA; Mazzucchelli, F; Sainz, A.: Fisiopatología de las proteínas séricas. *Ciencias Veterinarias*, 13: 467-472, 1994.

- Tesouro, MA.: Nuevos conceptos en el seguimiento y control de la leishmaniosis canina. *Curso de Enfermedades Vectoriales en el Perro*, pp. 23-27, 23-24/Sep, Madrid, 1995a.

- Tesouro, MA et Sainz, A.: Ehrlichiosis canina. Casos clínicos. Concurrencia con otros procesos. *Curso de Enfermedades Vectoriales*, pp. 49-54, 23-24/Sep, Madrid, 1995b.

- Tesouro, MA; Amusatogui, I; Mazzucchelli, F; Sainz, A; Rodríguez, F.: Tratamientos actuales. En: *Tratamiento de la leishmaniosis canina. Encuesta epizootológica en la Comunidad Autónoma de Madrid*, pp. 7-54. Ed. por Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid, Madrid 28009, 1995c.

- Thakur, CP; Kumar, M; Kumar, P; Mishra, BN; Pandey, AK.: Rationalisation of regimens of treatment of kala-azar with sodium stibogluconate in India: a randomised study. *British Med J*, 296: 1557-1561, 1988.

- Thakur, CP; Kumar, M; Pandey, K.: Comparison of regimens of treatment of antimony resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am J Trop Med Hyg*, 45(4): 435-441, 1991.

- Thakur, CP; Olliaro, P; Gothoskar, S; Bhowmick, S; Choudhury, BK; Prasad, S; Kumar, M; Verma, BB.: Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (=paramomycin)-antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 86: 615-616, 1992.

- Thakur, CP; Sinha, GP; Pandey, AK; Barat, D; Sinha, PK.: Amphotericin B in resistant kala-azar in Bihar. *Natl Med J India*, 6(2): 57-60, 1993.

- Thakur, CP; Sinha, GP; Pandey, AK; Barat, D; Singh, RK.: Daily versus alternate-day regimen of amphotericin in the treatment of kala-azar: a randomized comparison. *Bull WHO*, 72(6): 931-936, 1994.

- Thakur, CP; Pandey, AK; Sinha, GP; Roy, S; Behbehani, K; Olliaro, P.: Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (*AmBisome*) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(3): 319-22, 1996a.

- Thakur, CP; Sinha, GP; Pandey, AK.: Comparison of regimens of amphotericin B deoxycholate in kala-azar. *Indian J Med Res*, 103: 259-263, 1996b.

- Tizard, I.: Helper T cells and their response to antigen. En: *Veterinary Immunology. An Introduction 5th Ed (chapter 10)*. pp. 109-120. Ed. by Tizard, I. WB Saunders Company, Philadelphia, PA 19106, 1996.

- Torre-Cisneros, J; Villanueva, JL; Kindelan, JM; Jurado, R; Sánchez-Guijo, P.: Successful treatment of antimony-resistant visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, 17: 625-627, 1993.
- Torrus, D; Boix, V; Massa, B; Portilla, J; Pérez-Mateo, M.: Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*, 37:1042-43, 1996.
- Tremblay, M; Olivier, M; Bernier, R.: *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today*, 12(7): 257-262, 1996.
- Trotter, ER; Peters, W; Robinson, BL.: The experimental chemotherapy of leishmaniasis, IV. The development of a rodent model for visceral infection. *Ann Trop Med Paras*, 74(2): 127-138, 1980.
- Tzamouranis, N; Schnur, LF; Garifallou, A; Pateraki, E; Sérié, C.: Leishmaniasis in Greece I. *Ann Trop Med Parasitol*, 78(4): 363-368, 1984.
- *Vademecum Internacional*. Medimedia Medicom , 1997.
- *Vademecum de Veterinaria Garsi 92*. Editorial Garsi, S.A., 28028, Madrid, 1992.
- Valladares, JE; Alberola, J; Esteban, M; Arboix, M.: Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Record*, February 24: 181-183, 1996.
- Valladares, JE; Riera, C; Gallego, M; Alberola, J; Portús, M; Arboix, M.: Use of antimoniate-containing liposomes in the treatment of canine leishmaniasis. Kinetic comparison with the free form. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 185, Istanbul, 1997.
- Varela Balcells, F.: Inmunopatología de la leishmaniosis canina: bases teóricas y aspectos prácticos. *Premios Fundación Purina*, pp. 11-54, 1992.
- Velasco, A.: Fármacos antiprotozoarios, antihelmínticos y ectoparasiticidas. En: *Farmacología y su proyección a la clínica 15ª Ed (capítulo 70)*. pp. 875-891. Ed. por Lorenzo Velázquez, B. Oteo, Madrid, 1987.
- Vercammen, F et De Deken, R.: Treatment of canine visceral leishmaniasis with allopurinol. *Vet Record*, September 2: 252, 1995.
- Vercammen, F et De Deken, R.: Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine visceral leishmaniasis. *Vet Record*, September 14: 264, 1996.
- Vesco, G; Reale, S; Fasulo, G; Geraci, F; Capra, G; Maxia, L; Sammartino, C; Giannitrapani, V; Vitale, F.; Application of PCR in the diagnosis of leishmaniasis. *First World Congress on Leishmaniasis*, pp. 109, Istanbul, 1997.
- Vidor, E; Dereure, J; Pratlong, F; Debreuil, N; Bissuel, G; Moreau, Y; Rioux, JA.: Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine a *Leishmania infantum*. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 26(2): 133-137, 1991.
- Vilmer, C; Lemarchand Venencie, F; Le Doussal, V; Civate, J.: Leishmaniose cutanée ou bouton d'orient. Traitement par kétoconazole. *Presse Méd*, 15(27): 1287, 1986.
- Vitoria Miñana, I.: Kala-azar: revisión bibliográfica. *Pediátrika*, 6(IV): 232-243, 1984.
- Vitu, C; Sanchis, R; Giauffret, A.: Evolution des protéines sériques dans la leishmaniose canine. *Compt Rend Sci Soc Biol*, 167: 513-518, 1973.
- Vouldoukis, I; Drapier, JC; Nussler, AK; Tselentis, Y; Da Silva, OA; Gentilini, M; Mossalayi, DM; Monjour, L; Dugas, B.: Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(1): 253-256, 1996.

- Wasunna, KM; Raynes, JG; Were, JBO; Muigai, R; Sherwood, J; Gachihi, G; Carpenter, L; McAdam, KPWJ.: Acute phase protein concentrations predict parasite clearance rate during therapy for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89: 678-681, 1995.

- Weinrauch, L; Livshin, R; El-On, J.: Cutaneous leishmaniasis: treatment with ketoconazole. *Cutis*, 32: 288-290, 1983.

- Weldon, JS; Munnell, JF; Hanson, WL; Alving, CR.: Liposomal chemotherapy in visceral leishmaniasis: an ultrastructural study of an intracellular pathway. *Z Parasitenkd*, 69: 415-424, 1983.

- Wohlsein, P; Vilafranca, M; Brandes, B.: Concurrent leishmaniasis and filariasis in a dog. Leishmaniose und Filariose bei einem hund. *Kleintierpraxis*, 41(5): 367-374, 1996.

- Zijlstra, EE; Siddig Ali, M; El-Hassan, AM; Cher Hofland, HW; El-Toum, I; Satti, M; Ghalib, HW.: The treatment of kala-azar in the Sudan with sodium stibogluconate: a randomized trial of three dosage regimens. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87: 307-309, 1993.

- Zuckerman, A et Lainson, R.: *Leishmania*. En: *Parasitic Protozoa.I*. pp. 57-133. Ed. by Kreier. Academic Press, Inc, 10003, NY, 1977.