

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo farmacéutico de formulaciones de
poliagregados de anfotericina B**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Cristina Moreno Rodríguez

Directores

Santiago Torrado Durán, Susana Torrado Durán

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0759-9

© Ana Cristina Moreno Rodríguez, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO FARMACÉUTICO DE
FORMULACIONES DE POLIAGREGADOS
DE ANFOTERICINA B**

ANA CRISTINA MORENO RODRÍGUEZ

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO FARMACÉUTICO DE
FORMULACIONES DE POLIAGREGADOS
DE ANFOTERICINA B**

ANA CRISTINA MORENO RODRÍGUEZ

DIRECTORES:

Santiago Torrado Durán

Susana Torrado Durán

Madrid, 2011

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer, en primer lugar, a la profesora Dra. D^a. Irene Teresa Molina Martínez, Profesora Titular y Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en su Departamento.

Mi agradecimiento a los directores de mi Tesis, Dra. D^a. Susana Torrado Durán y Dr. D. Santiago Torrado Durán, no sólo por sus directrices y propuestas en la línea de investigación y el apoyo incondicional a lo largo de estos años sino también por su calidad humana de la que he sido objeto.

No puedo olvidar a Dr. D. Juan José Torrado Durán ni a Dra. D^a. María Paloma Ballesteros Papantonakis, por los procedimientos de utilización del material de laboratorio y las propuestas durante la realización de la Tesis.

Asimismo, agradezco a la Dra. D^a. María Gloria Molero Martín-Portugués, perteneciente al Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, su valiosa contribución en la parte experimental de la investigación así como sus sugerencias en el transcurso de la misma.

A la inestimable ayuda de la Dra. D^a. Covadonga Álvarez Álvarez, por la generosidad de su amistad y el incansable optimismo que me ha transmitido en este tiempo.

Agradezco al Dr. D. Guillermo Torrado Durán, Profesor Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá de Henares, sus recomendaciones y consejos así como su aliento tanto en el ámbito docente como en el profesional.

Quiero hacer especial mención a la Dra. D^a. Modesta Estada López, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por su capacidad de comunicación durante mi etapa de formación así como sus consejos y orientación, fomentando siempre la ilusión por un trabajo bien hecho y valorando siempre la importancia de la constancia en el día a día.

Mi reconocimiento a todos los demás profesores de este Departamento, por el interés mostrado ante cualquier cuestión suscitada, y a todos los compañeros, por todos los buenos momentos compartidos en estos años y a su colaboración voluntaria en la parte experimental.

Quiero agradecer de todo corazón a mi familia, especialmente, a mis padres, Marisa y Juan Carlos, y a mi hermano, Carlos, su paciencia, cariño, comprensión y ánimo durante todos estos años, desde el comienzo de los estudios universitarios hasta el día de hoy así como el entusiasmo y la resolución mostrados no sólo por ellos sino por también por mis amigos .

En definitiva, a todos y cada uno de ustedes, mis más sinceras gracias por permitirme vivir este momento.

A mis padres, Marisa y Juan Carlos,

Y a mi hermano, Carlos

ÍNDICE GENERAL

<u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
<u>OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO</u>	23
<u>CAPÍTULO 1. ESTUDIO FARMACOTÉCNICO DE LAS FORMULACIONES DE ANFOTERICINA B Y DESOXICOLATO DE SODIO</u>	27
<u>CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ÚNICA</u>	77
<u>CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS MÚLTIPLES</u>	137
<u>CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ALTERNAS</u>	171
<u>CONCLUSIONES</u>	215

ÍNDICE CAPÍTULOS

<u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.- CANDIDIASIS SISTÉMICAS	3
2.- TRATAMIENTOS ANTIFÚNGICOS	7
2.1.- Clasificación de los antifúngicos	7
2.2.- Mecanismo de acción de los agentes antifúngicos	7
3.- LA ANFOTERICINA B	11
3.1.- Características físico-químicas de la anfotericina B	11
3.2.- Actividad antifúngica	13
3.3.- Mecanismos de acción	13
3.4.- Efectos adversos	14
3.5.- Interacciones con otros fármacos	15
3.6.- Formulaciones comercializadas de anfotericina B	16
4.- BIBLIOGRAFÍA	19
<u>OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO</u>	23
1.- OBJETIVO	25
2.- PLANTEAMIENTO	25

<u>CAPÍTULO 1. ESTUDIO FARMACOTÉCNICO DE LAS FORMULACIONES DE ANFOTERICINA B Y DESOXICOLATO DE SODIO.</u>	27
1.- INTRODUCCIÓN	29
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1.- Materiales	39
2.1.1.- <u>Productos y reactivos</u>	39
2.2.- Métodos	39
2.2.1.- <u>Método de elaboración de las formulaciones liofilizadas de anfotericina B y desoxicolato de sodio</u>	39
2.2.2.- <u>Estudio morfológico de las distintas formulaciones</u>	40
2.2.3.- <u>Determinación del tamaño de partícula y del índice de polidispersabilidad (PDI)</u>	40
2.2.4.- <u>Determinación del estado de agregación</u>	41
2.2.5.- <u>Análisis de la anfotericina B por HPLC en muestras biológicas</u>	41
3.- RESULTADOS	51
3.1.- Estudio del estado de agregación de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio	51
3.2.- Estudio morfológico de las partículas de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio	54
3.3.- Estudio del tamaño de partícula y del índice de polidispersabilidad (PDI)	59
3.4.- Concentraciones de anfotericina B en órganos a las 24 h	62
4.- DISCUSIÓN	69
5.- BIBLIOGRAFÍA	73

<u>CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ÚNICA</u>	77
1.- INTRODUCCIÓN	79
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	87
2.1.- Materiales	87
2.1.1.- <i>Productos y reactivos</i>	87
2.1.2.- <i>Material biológico</i>	87
2.2.- Métodos	88
2.2.1.- <i>Método para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)</i>	88
2.2.2.- <i>Método para la determinación del efecto post-antifúngico (PAFE)</i>	89
2.2.3.- <i>Método para la determinación de FICI</i>	90
2.2.4.- <i>Método para determinar la curva de letalidad</i>	90
2.2.5.- <i>Determinación de la actividad hemolítica de las formulaciones de anfotericina B</i>	91
2.2.6.- <i>Modelo de infección en ratones</i>	92
2.2.7.- <i>Administración del tratamiento</i>	93
3.- RESULTADOS	95
3.1.- Estudio de los valores de concentración mínima inhibitoria	95
3.2.- Estudio del efecto post-antifúngico (PAFE)	95
3.3.- Estudio de los valores del índice fraccional de concentración inhibitoria	99
3.4.- Estudios de las curvas de letalidad obtenidas tras la administración de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio	99
3.5.- Estudio de la actividad hemolítica de las formulaciones de anfotericina B ...	105
3.6.- Estudio de morfología y funcionalidad renal y hepática de los ratones infectados por <i>C. albicans</i> tras la administración de las formulaciones	109
3.7.- Estudio de supervivencia de los ratones infectados por <i>C. albicans</i> tras la administración de las formulaciones	116
3.8.- Estudio de colonización a nivel renal y cerebral por <i>Candida albicans</i>	120
4.- DISCUSIÓN	123
5.- BIBLIOGRAFÍA	131

<u>CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS MÚLTIPLES</u>	137
1.- INTRODUCCIÓN	139
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	145
2.1.- Materiales	145
2.1.1.- <i>Productos y reactivos</i>	145
2.1.2.- <i>Material biológico</i>	145
2.2.- Métodos	146
2.2.1.- <i>Método para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)</i>	146
2.2.2.- <i>Método para la determinación de la concentración mínima fungicida (MFC)</i>	147
2.2.3.- <i>Modelo de infección en ratones</i>	147
2.2.4.- <i>Administración del tratamiento</i>	148
3.- RESULTADOS	151
3.1.- Estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MFC)	151
3.2.- Estudio de la morfología y funcionalidad renal	153
3.3.- Estudio de supervivencia de los ratones infectados por <i>C. albicans</i> tras la administración de las formulaciones	156
3.4.- Estudio de colonización a nivel renal y cerebral por <i>Candida albicans</i>	162
4.- DISCUSIÓN	165
5.- BIBLIOGRAFÍA	167

<u>CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ALTERNAS</u>	171
1.- INTRODUCCIÓN	173
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	181
2.1.- Materiales	181
2.1.1.- <i>Productos y reactivos</i>	181
2.1.2.- <i>Material biológico</i>	181
2.2.- Métodos	182
2.2.1.- <i>Modelo de infección</i>	182
2.2.2.- <i>Administración del tratamiento</i>	182
2.2.3.- <i>Determinación de la eficacia y toxicidad de los tratamientos</i>	184
3.- RESULTADOS	185
3.1.- Estudio de la morfología y funcionalidad renal y hepática	185
3.2.- Estudio de la eficacia de los tratamientos de anfotericina B y desoxicolato de sodio	198
3.3.- Estudio de la colonización a nivel renal y cerebral por <i>Candida albicans</i>	202
4.- DISCUSIÓN	207
5.- BIBLIOGRAFÍA	211

INTRODUCCIÓN GENERAL.

INTRODUCCIÓN GENERAL.

1.- CANDIDIASIS SISTÉMICAS.

Las infecciones fúngicas a nivel sistémico cursan con una elevada morbi y mortalidad, que origina un aumento de los tiempos de hospitalización de pacientes así como los costes de los tratamientos, hechos que hacen que sea necesario investigar sobre posibles mejoras en su tratamiento (Masuoka, J., 2004).

En el año 2000, la mitad de estas infecciones estaban originadas por *Candida albicans* aunque se observó un incremento en la frecuencia en las infecciones originadas por otras especies de *Candida* como *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis* (Masuoka, J., 2004).

Calderone, R.A. y Braun, P.C., 1991, indican que *C. albicans*, un organismo comensal presente en las mucosas, adquiere características invasivas cuando algún aspecto de la inmunidad del huésped se encuentra alterada. De esta manera, el tipo de infección por *C. albicans* depende de los defectos específicos del huésped. Las infecciones sistémicas aparecen cuando existe una disminución en el recuento de los neutrófilos mientras que las patologías cutáneas y mucocutáneas dependen de la inmunidad mediada por células.

Candida spp. presenta, al menos, tres formas de crecimiento, los blastoconidios, normalmente responsables de la colonización de la piel y de las mucosas oral, vaginal y del tracto gastrointestinal, estructuras filamentosas, originadas tras la germinación de los blastoconidios, y como pseudohifas, estructuras que aparecen en los procesos de elongación de los blastoconidios (Calderone, R.A. y Braun, P.C., 1991).

La pared celular de *C. albicans* es esencial en su actividad patógena ya que es necesaria en su crecimiento, confiere rigidez y protección frente a cambios osmóticos siendo el lugar de contacto entre el microorganismo y el

medioambiente como indican Calderone, R.A. y Braun, P.C., 1991). La estructura de la pared celular muestra en la Figura 1.

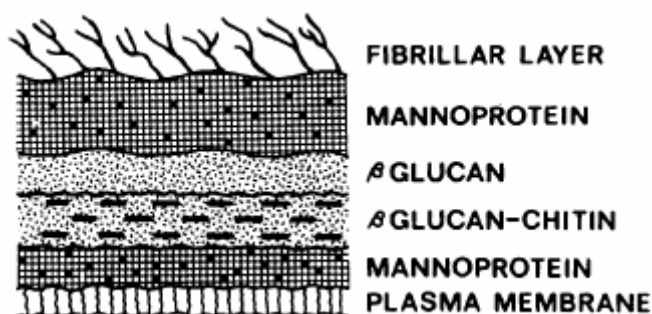


Figura 1.- Diagrama esquemático de la pared celular de *C. albicans*. Los componentes mayoritarios de las capas se encuentran indicados a la derecha de la imagen (Calderone, R.A. y Braun, P.C., 1991).

La composición de esta pared celular incluye una serie de componentes básicos como, D-glucosa, N-acetil-D-glucosamina y D-manosa (Figura 2) que se asocian en moléculas más complejas, concretamente glucanos, quitina y mananos (Martínez, J P. y col., 1998, y Masuoka, J., 2004).

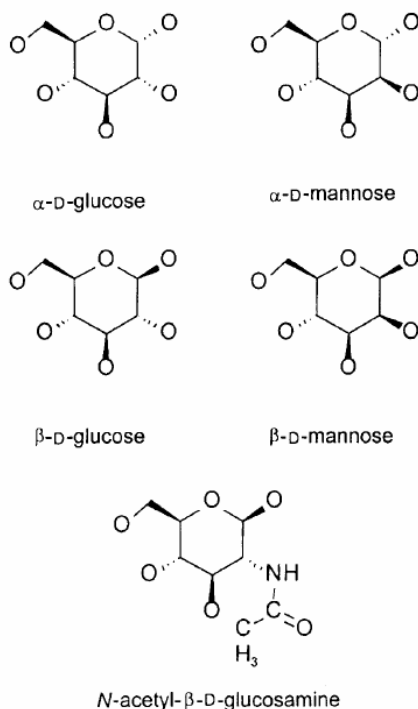


Figura 2.- Monosacáridos constituyentes de la pared celular de *C. albicans*.

Los glucanos, homopolímeros de glucosa, constituyen entre el 47% y el 60% del peso de la pared celular (Calderone, R.A. y Braun, P.C., 1991). Se caracterizan por presentar uniones β -1,3, que favorecen la estructura helicoidal, y β -1,6, más frecuentes en *C. albicans*, que, como indica Masuoka, permiten obtener estructuras extensas y flexibles (Masuoka, J., 2004).

La quitina está compuesta por polímeros lineales de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina y sus proporciones en las paredes celulares de las hifas triplican al encontrado en las levaduras, actuando como un mecanismo de rescate de la integridad celular ya que la producción de quitina se encuentra incrementada en las células en las que la calidad o la cantidad de glucano está disminuida (Masuoka, J., 2004). Su proporción en la pared celular (referido al peso) oscila del 0,6% al 9% (Calderone, R.A. y Braun, P.C., 1991).

Los mananos se caracterizan por ser polímeros de manosa que se encuentran unidos bien a lípidos, originando glicolípidos, bien a proteínas, formando glicoproteínas (Masuoka, J., 2004). Representan entre el 15,2% y el 22,9% del peso seco de la levadura o alrededor del 40% del peso de los polisacáridos de la pared celular según los datos aportados por Calderone, R.A. y Braun, P.C., 1991. Estos autores indican que los mananos, identificados primero como los antígenos de superficie mayoritarios antes de que su estructura fuese identificada, presentan uniones con las proteínas bien con uniones mediante el oxígeno a través de la serina o de la treonina en el caso de los oligosacáridos cortos bien con nitrógeno uniendo los oligosacáridos complejos de N-acetil-D-glucosamina a residuos de asparragina de los polipéptidos. Existe un acuerdo general en el que se establece que las cadenas de mananos presentan epítomos que confieren seroespecificidad a la pared celular.

En cuanto a la composición de la membrana fúngica el ergosterol es el esteroles mayoritario de la misma (Demel, R.A. and De Kruffyff, B. 1976).

2.- TRATAMIENTO ANTIFÚNGICOS.

Los tratamientos de las micosis sistémicas consisten en la administración de agentes antifúngicos que pueden actuar bien como fungistáticos, impidiendo el crecimiento de los hongos, bien como fungicidas, provocando la lisis celular. En ambos casos, las dosis administradas de estos medicamentos deben ser las adecuadas para evitar daños en las células humanas como indica Rotger, R., 1997.

2.1.- Clasificación de los antifúngicos.

Los agentes antifúngicos se pueden clasificar de manera general en los siguientes grupos:

1. **Polienos** como la anfotericina B y la nistatina.
2. **Azoles** que se pueden subclasificar en:
 - a. Imidazoles como el miconazol y el ketoconazol.
 - b. Triazoles como el fluconazol e itraconazol.
3. **Derivados de las alilaminas** como la terbinafina.
4. **Derivados de las morfolininas** donde se incluye la amorolfina.
5. **Benzofuranos** como la griseofulvina.
6. **Equinocandinas** como la caspofungina y la micafungina.
7. **Pirimidinas** donde se incluyen encuentra 5-fluorocitosina.

2.2.- Mecanismo de acción de los agentes antifúngicos.

Los **polienos** se caracterizan por afectar a la membrana plasmática de las células fúngicas (Rotger, R., 1997) actuando de manera preferente sobre las moléculas del ergosterol como indican Huang, W. y col., 2002. Su estructura

heterocíclica anfipática se integra en la bicapa lipídica, uniéndose a los esteroides y agregándose en forma de anillo para formar poros que afectan a la integridad de la membrana plasmática y permite el flujo de cationes como el ión potasio (K^+) por lo que presenta actividad fungicida sobre *C. albicans* (Canon, R.D. y col., 2007).

Tanto los azoles como las alilaminas y las morfolinas actúan en la síntesis de ergosterol.

Los **azoles** son principalmente fungistáticos de amplio espectro pudiendo actuar tanto en levaduras, en hongos dimórficos y en hongos filamentosos (Rotger, R., 1997). Forman un complejo con el citocromo P-450 de manera que se inhibe la 14C-desmetilasa que actuaría en el lanosterol, precursor del ergosterol como indica Rotger, R., 1997, y que se encuentra codificado en el gen *ERG11* como indican Cannon, R.D. y col., 2007. Este hecho evita la síntesis de ergosterol y origina la acumulación de lanosterol en la célula fúngica inhibiendo el crecimiento celular (Rotger, R., 1997).

Al igual que el caso de los azoles, los **derivados de las alilaminas** actúan en la síntesis del ergosterol, actuando en este caso en la escualeno-epoxidasa, precursor del ergosterol. La actividad fungicida de estas moléculas depende de la acumulación de escualeno en la célula y son activas frente a dermatofitos y hongos productores de micetoma (Rotger, R., 1997).

Los **compuestos derivados de la morfolina** (amorolofina) presentan actividad fungistática y fungicida dependiendo de la concentración utilizada. Actúan en la ruta biosintética del ergosterol inhibiendo las isomerasas y reductasas que actúan en su síntesis (Rotger, R., 1997).

La **griseofulvina**, perteneciente al grupo de los benzofuranos, interacciona con los microtúbulos impidiendo la separación de los cromosomas y, en consecuencia, la mitosis (Rotger, R., 1997).

Las **equinocandinas** son lipopéptidos cíclicos semisintéticos obtenidos originalmente de hongos terrestres aunque se han desarrollado derivados semisintéticos. Se piensa que estas sustancias activas actúan en la pared celular interfiriendo en la biosíntesis mediante la inhibición de la (1,3)-D- β -glucanosintasa presentando actividad fungicida en levaduras como *Candida albicans* (Cannon, R.D. y col., 2007).

La **fluorocitosina** o **fluocitosina** es un profármaco fluorado análogo de la pirimidina que actúa en el interior de la célula fúngica. Esta molécula se introduce en la célula fúngica por acción de una permeasa y mediante una reacción de desaminación se transforma en 5-fluorouracilo inhibiendo las síntesis de ácidos nucleicos. Además, se incorpora al RNA sustituyendo al uracilo e interfiere en la síntesis de DNA (Rotger, R., 1997). Como indica este autor, la fluorocitosina puede presentar actividad fungicida o fungistática dependiendo de la concentración que alcance en el interior del hongo.

Los lugares de acción de la amorolfina así como de las alilaminas y del grupo de los polienos (anfotericina B y nistatina) en el ergosterol o en su ruta de síntesis se muestra en la Figura 3.

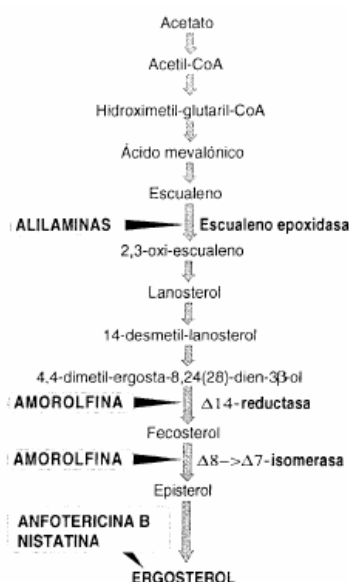


Figura 3.- Rutas enzimáticas del ergosterol y enzimas que son inhibidas por los antifúngicos. La anfotericina B y la nistatina interaccionan con el ergosterol en la membrana citoplasmática (Rotger, R., 1997).

En la Figura 4 se muestran de manera general los lugares de acción de los agentes antifúngicos.

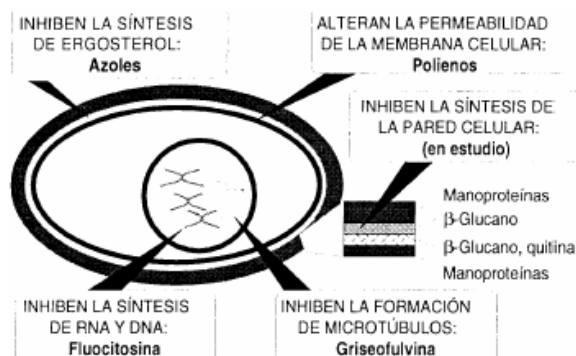


Figura 4.- Lugar de acción de los agentes antifúngicos (Rotger, R., 1997).

De estos antifúngicos, cuatro grupos terapéuticos actúan contra *C. albicans*, los polienos, los azoles, las equinocandinas y la 5-fluorocitosina. En la Figura 5 se muestran los mecanismos de acción de fármacos antifúngicos empleados en el tratamiento de *Candida albicans*.

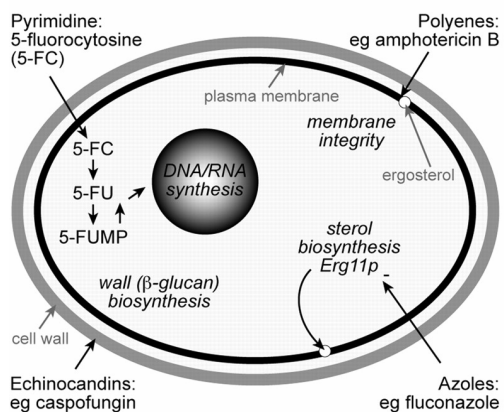


Figura 5.- Dianas celulares de los fármacos antifúngicos en *C. albicans* (Cannon, R.D. y col., 2007).

3.- LA ANFOTERICINA B

3.1.- Características físico-químicas de la anfotericina B.

La anfotericina B se encuentra descrita en la Farmacopea Europea como una mezcla de antifúngicos poliénicos producida por el crecimiento de determinadas cepas de *Streptomyces nodosus* u obtenida de cualquier otro modo. Consiste principalmente en anfotericina B.

La anfotericina B es el ácido (1*R*, 3*S*, 5*R*, 6*R*, 9*R*, 11*R*, 15*S*, 16*R*, 17*R*, 18*S*, 19*E*, 21*E*, 23*E*, 25*E*, 27*E*, 29*E*, 31*E*, 33*R*, 35*S*, 36*R*, 37*S*)-33-[(3-amino-3,6-didesoxi-β-D-manopiranosil)oxi]-1, 3, 5, 6, 9, 11, 17, 37-octahidroxi-15,16,18-trimetil-13-oxo-14,39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19, 21, 23, 25, 27, 29, 31-heptaeno-36-carboxílico, su fórmula molecular es C₄₇H₇₃NO₁₇ y su masa relativa es 924. Su estructura molecular se muestra en la Figura 6 (Farmacopea Europea, 2005).

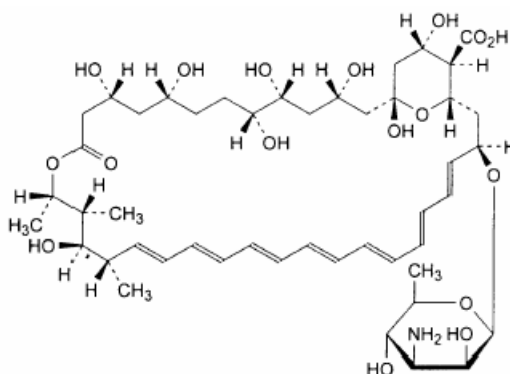


Figura 6.- Estructura de anfotericina B.

La **apariencia** de la anfotericina B se caracteriza por ser un sólido pulverulento amarillo o naranja higroscópico (Farmacopea Europea, 2005).

Por su estructura, presenta **carácter anfótero**, es decir, como ácido ya que presenta un grupo carboxílico que actúa como donador de protones o como base debido a su grupo amínico, aceptor de protones (Sánchez-Brunete, J. A., 2002).

En cuanto a su **solubilidad**, la anfotericina B es prácticamente insoluble en agua, soluble en dimetilsulfóxido y en propilenglicol, ligeramente soluble en dimetilformamida, muy ligeramente soluble en metanol y prácticamente insoluble en etanol. En soluciones diluidas es sensible a la luz como indica la Farmacopea Europea.

En el análisis de la anfotericina B se pueden detectar **impurezas** cuyos niveles serán controlados siguiendo los límites establecidos por la Farmacopea Europea. De esta manera, se encuentran dos impurezas definidas la impureza A o anfotericina A (28,29-dihidro-anfotericina B), cuya estructura se muestra en la Figura 7 y la impureza B o anfotericina X1 (13-O-metil-anfotericina B), representada en la Figura 8.

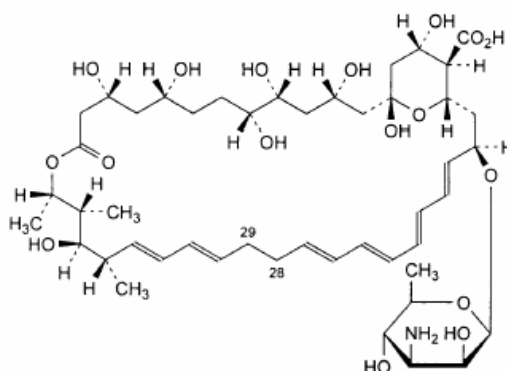


Figura 7.- Estructura de la anfotericina A.

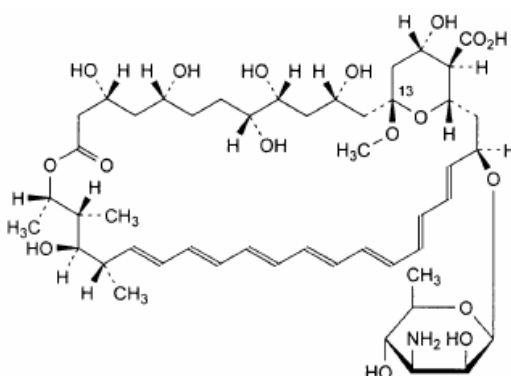


Figura 8.- Estructura de la impureza B o anfotericina X1.

La **conservación** de la anfotericina B ha de ser en un recipiente hermético protegida de la luz y entre 2° y 8° C como indica la Farmacopea Europea

(2005). Este hecho puede ser entendido al analizar los estudios realizados por Groeschke, J. y col., 2006, quienes analizaron la influencia de la luz y de la temperatura sobre la sustancia activa. La degradación de la anfotericina B es mayor al estar expuesta a la luz o a temperaturas de 19-23°C o 37°C.

3.2.- Actividad antifúngica.

La anfotericina B presenta actividad frente a *Absidia* spp., *Aspergillus* spp., *Basidiobolus* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* spp., *Coccidioides immitis*, *Conidiobolus* spp.; *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucor* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp. y *Sporothrix schenckii* mostrando un rango de concentraciones mínimas inhibitorias entre 0,03 y 1 µg/ml para la mayoría de estos patógenos (Martindale, 1999).

No obstante, puede actuar en protozoos como *Leishmania* y *Naegleria* y en algas como *Prototheca* spp. Sin embargo, no presenta actividad en infecciones bacterianas, víricas u originadas por rickettsias (Martindale, 1999).

3.3.- Mecanismo de acción.

La actividad antifúngica de la anfotericina B es dosis dependiente de manera que según la dosis administrada podrá presentar una actividad fungicida o fungistática (Sánchez-Brunete, J.A., 2002).

La anfotericina B se une al ergosterol, el esteroles mayoritario de las células fúngicas originando cambios en la permeabilidad celular lo que origina la lisis de las mismas como indican Yu, B.G. y col., 1998 y Zaoutis, T.E. y col., 2005. La alteración de las membranas fúngicas se debe a la formación de poros transmembrana (Huang, W. y col., 2002 y Yu, B.G. y col., 1998).

Como indican Zaoutis, T.E. y col., 2005, la presencia de resistencias puede ser debida a los cambios en los esteroides de membrana así como a la disminución del contenido de ergosterol en las membranas de las células fúngicas disminuyendo la afinidad de unión de los esteroides a la anfotericina B.

3.4.- Efectos adversos.

La anfotericina B es uno de los fármacos de elección en el tratamiento de las candidiasis. Sin embargo, presentan distintos efectos adversos que están condicionados por el estado de agregación que presenta la sustancia activa siendo el estado monomérico, dimérico o poliagregado de la anfotericina B el responsable de gran parte de la toxicidad de las formulaciones (Espuelas, M.S. y col., 2003).

La administración de la anfotericina B puede ir acompañada por dolor de cabeza, náuseas, vómitos, escalofríos, fiebre, malestar, dolor muscular y articular, anorexia, diarrea y calambres gastrointestinales. Además pueden presentar ocasionalmente hipertensión o arritmias cardiovasculares incluyendo las fibrilaciones ventriculares y paradas cardíacas, reacciones anafilácticas, visión borrosa, tinnitus, pérdida de oído, desórdenes hepáticos, neuropatías periféricas y convulsiones. Ocasionalmente pueden aparecer trombocitopenia, agranulocitosis, leucopenia y defectos en la coagulación (Martindale, 1999).

Dentro de estas reacciones adversas, existen dos que presentan especial importancia, la nefrotoxicidad y la anemia normocítica normocrómica reversibles (Martindale, 1999).

No obstante, el principal efecto adverso posiblemente es la nefrotoxicidad (Sánchez-Brunete, J.A. y col., 2004). Esta toxicidad cursa con daños glomerulares y tubulares y está acompañada por un incremento de la excreción de potasio y magnesio originando hipocalcemia o hipomagnesemia respectivamente (Martindale, 1999 y Deray, G., 2002), además puede originar acidosis tubular renal y poliuria en el 50-100% de los pacientes tratados (Deray,

G., 2002). Esta nefrotoxicidad cursa con vasoconstricción y una interacción directa con las membranas epiteliales y, en consecuencia, se produce una disminución de la filtración glomerular y la disfunción tubular (Deray, G., 2002).

La influencia de la nefrotoxicidad de la anfotericina B es muy elevada siendo frecuentes los fallos renales agudos, cuyos niveles se establecen entre el 49% y el 65% (Deray, G., 2002). Es más, estudios realizados por Wingard, J.R. y col., 1999, mostraban el incremento significativo de la creatinina sérica al comparar dichos niveles con los niveles basales en un porcentaje superior al 50% de la población, concretamente el 53% de los pacientes duplicaban los valores de creatinina y el 29% presentaba un descenso de la funcionalidad renal de, al menos, un 70%.

La nefrotoxicidad originada por esta sustancia activa puede estar influenciada por factores de riesgo potenciales como la dosis media de anfotericina B administrada al paciente o la administración de dosis acumulativa, la deshidratación, función basal de los riñones alterada, la administración concomitante de sustancias activas nefrotóxicas como la ciclofosfamida o pacientes con riesgo elevado como aquellos pacientes que hayan sido sometidos al trasplantes alogénicos o autólogos de médula ósea frente a los trasplantes sólidos (Deray, G., 2002).

3.5.- Interacciones con otros fármacos.

Randanelli, R., 1988, indica la posible interacción de la anfotericina B con otros fármacos como son los corticosteroides, los glicósidos digitálicos, la 5-flucitosina y el miconazol. No obstante, Martindale, 1999, muestra un listado más extenso respecto a las incompatibilidades de la anfotericina B donde se incluyen fármacos como el sulfato de amikacina, ampicilina, bencilpenicilina, cloruro cálcico, nitrofurantoína sódica, hidroclouros de difenidramina y dopamina así como el cloruro potásico o algunos conservantes como la alcohol bencílico, el cloruro sódico y las vitaminas entre otros.

Al administrarse la anfotericina B junto con corticoides se potencia la hipocalcemia originada por la anfotericina B siendo necesaria la monitorización de los electrolitos como indican Randanelli, R., 1988.

En el caso de los glucósidos cardiacos y debido a la depleción de potasio originada por el antifúngico se potencia la toxicidad de los digitálicos de manera que los niveles plasmáticos de potasio han de ser controlados (Randanelli, R., 1988).

La toxicidad renal de la 5-flucitosina puede incrementarse al ser administrada conjuntamente con la anfotericina B ya que se altera la excreción renal aumentando los niveles plasmáticos de la flucitosina. En aquellos pacientes que sean tratados de manera simultánea con ambos antifúngicos se deberán controlar los niveles plasmáticos de flucitosina así como la función renal. Sin embargo, la administración conjunta de anfotericina B con el miconazol se caracteriza por el carácter antagónico que presentan aunque aún se desconoce su acción (Randanelli, R., 1988).

3.6.- Formulaciones comercializadas de anfotericina B.

La anfotericina B se encuentra convencionalmente formulada junto al desoxicolato de sodio (Fungizona[®]) pero su uso se encuentra limitado debido a los efectos adversos agudos y crónicos que origina (Espada, R. y col., 2008).

Las formulaciones de anfotericina B lipídicas empleadas en la práctica terapéutica fueron descritas por Deray, G., 2002, en las que encontramos el AmBisome[®], con una estructura liposómica, complejos lipídicos como el Abelcet[®] o las dispersiones coloidales de anfotericina B donde se encuentran el Amphocil[®] y el Amphotec[®].

La anfotericina B puede encontrarse en estructuras micelares al ser formuladas con desoxicolato de sodio o en formulaciones lipídicas como indican Brajtburg, J. y Bolard, J., 1996.

Estos autores determinan que en el caso de la anfotericina B, formulada junto con desoxicolato de sodio, aparecen agregados micelares de anfotericina B y desoxicolato de sodio y micelas de surfactante puro. Al diluir las muestras, las micelas de desoxicolato de sodio van desapareciendo y se produce la pérdida del desoxicolato sódico de los agregados micelares de la anfotericina B.

La concentración del tensioactivo resulta ser crítica para la formación de micelas de modo que estas aparecen al introducirse las moléculas de anfotericina B en las micelas de desoxicolato de sodio. Si la concentración de desoxicolato de sodio resulta elevada se producen micelas de anfotericina B en forma monomérica unida al desoxicolato mientras que si la concentración de surfactante es todavía mayor aparecerán también micelas de surfactante puro.

La formulación de anfotericina B junto con fosfolípidos puede originar vesículas unilaminares y vesículas multilaminares. En función de las estructuras que presenten los fosfolípidos así se presentará la anfotericina B. En el caso de las vesículas unilaminares cortas, la anfotericina B se dispone en el espacio lipídico mientras que en las vesículas multilaminares, una proporción de anfotericina B considerable se encuentra en los compartimentos acuosos mientras que en las vesículas unilaminares largas presentan unas características físicas entre las vesículas multilaminares y las vesículas unilaminares cortas. No obstante, la conformación de la anfotericina B se encuentra influida por la estructura de los fosfolípidos, que pueden ser insaturados o saturados. Es más, la incorporación de la anfotericina B al liposoma puede modificar su estructura espacial como tal.

En cuanto a la toxicidad de estas formulaciones, Deray, G., 2002, recoge datos obtenidos en diversos ensayos clínicos en los que se compara la toxicidad renal de las distintas formulaciones lipídicas frente a la anfotericina B. La incorporación de la anfotericina B en formulaciones lipídicas permiten la disminución de las alteraciones renales al compararla con los resultados obtenidos tras la administración de la sustancia activa.

A pesar de que estas formulaciones lipídicas disminuyen los efectos tóxicos de la anfotericina B, su utilización se encuentra limitada por los costes que presentan (Sánchez-Brunete, J.A. y col., 2004). Además, la disminución de los efectos tóxicos va acompañada de la reducción de la actividad de la anfotericina B como indica Espuelas, M.S. y col., 2003.

4.- BIBLIOGRAFÍA.

- Brajtburg J y Bolard J. 1996. "Carrier effects on biological activity of amphotericin B". *Clinical Microbiology Reviews* 9:512-531.
- Calderone RA y Braun PC. 1991. "Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*". *Microbiological Reviews* 55:1-20.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M y Monk BC. 2007. "*Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress". *Microbiology* 153:3211-3217.
- Demel RA y De Kruffyff B. 1976. The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457 109-132.
- Deray G. 2002. "Amphotericin B nephrotoxicity". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, Suppl. S1, 37-41.
- Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bolás F y Torrado JJ. 2008. "*In vivo* distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:1125-1131.
- Espuelas MS, Legrand P, Campanero MA, Appel M, Chéron M, Gamazo C, Barratt e Irache JM. 2003. "Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:419-427.
- Farmacopea Europea. Consejo de Europa. 6ª edición. 2010.

- Groeschke J, Solassol I, Bressolle F y Pinguet F. 2006. "Stability of amphotericin B and nystatin in antifungal mounthrinses containing sodium hydrogen carbonate". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42:362-366.
- Huang W, Zhang Z, Han X, Tang J, Wang J, Dong S y Wang E. 2002. "Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy". *Biophysical Journal* 83:3245-3255.
- *Martindale. the Extra Pharmacopoeia*. The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 32^a edición. 1999.
- Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL y Chaffin WLJ. 1998. "Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*". *Clinical Microbiology Reviews* 11:121-141.
- Masuoka J. 2004. "Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges". *Clinical Microbiology Reviews* 17:281-310.
- Randanelli R. 1988. "*Clinical pharmacology of drug interaction*". Piccin Editore.
- Rotger Anglada R. 1997. "Microbiología Sanitaria y Clínica". *Editorial Síntesis*.
- Sánchez-Brunete JA. 2002. "Microesferas de anfotericina B para el tratamiento de la leishmaniosis visceral". *Tesis Doctoral*.

- Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Raposo R, Méndez MT, Torrado S-Santiago y Torrado JJ. 2004. "Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:3246-3252.
- Yu BG, Okano T, Kataoka K y Kwon G. 1998. "Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B". *Journal of Controlled Release* 53:131-136.
- Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Walshe L, Bowden R, Anaissie E, Hiemenz J y Lister J. 1999. "Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis". *Clinical Infectious Diseases* 29:1402-1407.
- Zaoutis TE, Benjamin DK y Steinbach WJ. 2005. "Antifungal treatment in paediatric patients". *Drug Resistance Updates* 8:235-245.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

1. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es conocer la influencia de la incorporación de proporciones crecientes de desoxicolato de sodio, excipiente utilizado en las formulaciones intravenosas de anfotericina B, en las características farmacotécnicas, farmacocinéticas, toxicológicas y de eficacia en modelos de infección por *Cándida albicans*.

2. PLANTEAMIENTO.

Elaboración de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en distintas proporciones con las que se realizan los siguientes estudios:

1- Estudio del estado de agregación y tamaño de partícula de las formulaciones en función de la concentración del antifúngico y de las proporciones del tensioactivo.

2- Evaluación de la influencia de las distintas proporciones de desoxicolato de sodio en las formulaciones de anfotericina B sobre: la actividad hemolítica *in vitro*, la actividad microbiológica *in vitro* frente a un modelo de *Candida albicans* y la concentración de anfotericina B que se alcance en diferentes órganos (riñón, hígado y bazo).

3- Estudios de toxicidad y eficacia en dosis única en un modelo de infección animal frente a *Candida albicans*. Los estudios de toxicidad renal y hepática incluirán la determinación de los correspondientes parámetros bioquímicos séricos. La eficacia a dosis única se evaluará mediante estudios de supervivencia en ratones infectados por *Candida albicans*.

4- Selección de las formulaciones y dosis con mejor relación beneficio/riesgo mediante sus estudios de eficacia y toxicidad a dosis múltiple. Para lo cual se correlacionarán las dosis administradas con la supervivencia de los animales, sus parámetros bioquímicos renales y hepáticos y el grado de infección cerebral y renal por *Candida albicans* tras el tratamiento.

5- Estudio de optimización del régimen de dosificación mediante la combinación tanto de diferentes formulaciones como de distintas dosis de anfotericina B que puedan alternar tratamientos de choque y mantenimiento para obtener la mejor eficacia erradicadora y los menores efectos tóxicos posibles.

ESTUDIO FARMACOTÉCNICO DE LAS FORMULACIONES DE
ANFOTERICINA B Y DESOXICOLATO DE SODIO

ESTUDIO FARMACOTÉCNICO DE LAS FORMULACIONES DE ANFOTERICINA B Y DESOXICOLATO DE SODIO.

1.- INTRODUCCIÓN.

El análisis de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio desde el punto de vista farmacotécnico se realizó mediante el estudio tanto del estado de agregación, del tamaño de partícula y de su observación mediante microscopia electrónica. Así mismo, se realiza una puesta a punto de una técnica analítica de HPLC para distintas muestras biológicas de ratones (plasma, bazo, hígado y riñones). Este estudio se realiza con la finalidad de relacionar el estado de agregación de las distintas formulaciones con la concentración de anfotericina B que se llega a alcanzar en estos órganos a las 24 horas post-administración.

Los estados de agregación de la anfotericina B determinan no solamente la actividad de las formulaciones sino también su posible toxicidad. La anfotericina B puede presentarse en diferentes estados de agregación, concretamente monomérico, dimérico y poliagregado.

La determinación del estado de agregación de los distintos compuestos objeto de estudio se realiza a través del análisis de los barridos en el ultravioleta visible (*UV-VIS*) realizados mediante espectrofotometría. Cada estado de agregación muestra unos valores de absorbancia máximos característicos.

Sánchez-Brunete, J.A. y col., 2004, en el estudio de la organización molecular de la anfotericina B, determinaron la existencia de un pico principal de absorbancia en el estado dimérico, característico de la formulación comercial Fungizona[®], a 328 nm. Sin embargo, cuando la anfotericina B se presenta en forma de poliagregados, similares a los obtenidos en el caso de la

formulación comercial Abelcet[®], los valores de absorbancia característicos se encuentran a 420, 392, 370 y 358 nm. En el caso de la anfotericina B en estado monomérico, los picos de absorción se sitúan en 406, 383 y 363 nm. Estos estados de agregación condicionan la toxicidad de la formulación de manera que las estructuras monoméricas y diméricas presentan una toxicidad mayor que las formas poliagregadas.

Espada, R. y col., 2008a, realizaron el estudio del estado de agregación en distintas formulaciones de anfotericina B, donde el principio activo se encuentra formulado en forma monomérica, dimérica y poliagregada. No obstante, el estudio comparativo se lleva a cabo con las formulaciones comercializadas Fungizona[®], Fungizona[®] sometida a calentamiento moderado (70° C) durante una hora y AmBisome[®]. Todas estas formulaciones fueron reconstituidas en caso de ser requerido y diluidas en agua desionizada si fuese necesario. El estado de agregación fue analizado en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, empleando longitudes de onda entre 300 y 450 nm.

Espada, R. y col., 2008a, observan en este trabajo que el tratamiento de calor moderado (70° C) produce cambios en la formulación comercial Fungizona[®], de forma que llega a presentar una estructura similar a la formulación comercial AmBisome[®], observándose una mezcla de estados de agregación. En este estudio, se aportan datos respecto a la menor toxicidad del AmBisome[®] frente a la Fungizona[®], observándose que los valores de hemólisis pueden verse modificados por el estado de agregación. De este modo, la Fungizona[®] sometida a calentamiento moderado muestra niveles hemolíticos tres veces inferiores a los obtenidos tras el tratamiento con Fungizona[®] que no ha sido sometida a calor moderado.

Autores como Larabi, M. y col., 2004, realizan estudios farmacotécnicos en una formulación de anfotericina B elaborada con dimiristoilfosfatidilcolina y dimiristoilfosfatidilglicerol. Estos autores observan en el análisis de la anfotericina B que, aunque la estructura de los espectros se mantenga al realizar los barridos de absorción a partir de unas soluciones más

concentradas, puede observarse un ligero desplazamiento de los picos de absorción. De este modo, la anfotericina B, disuelta en una concentración submicelar de 10^{-7} M en dimetilsulfóxido y agua, presenta las bandas de absorción en el espectro a 410, 385 y 365 nm y una banda, característica del estado monomérico, de menor intensidad, a 344 nm. Sin embargo, cuando se realiza el barrido de absorción a una concentración de 10^{-5} M se observa, por un lado, un incremento de la intensidad de la banda a 344 nm y, por otro, el desplazamiento de las bandas de absorción de 410 a 420 nm, de 385 a 390 nm y de 365 a 368 nm. Lo que se traduce como la aparición del estado poliagregado en la anfotericina B.

Larabi, M. y col., 2004, observaron la disminución de intensidad de las bandas del espectro de absorción no solamente al modificar las concentraciones de anfotericina B sino también al modificar las proporciones del principio activo en relación con los fosfolípidos empleados en las formulaciones.

En estos estudios realizados por Larabi, M. y col., 2004, las proporciones de anfotericina B/lípidos de entre el 10 y el 50% no permitían que toda la anfotericina B estuviese disuelta en los lípidos en la forma monomérica. Sin embargo, la interacción entre los lípidos y la anfotericina B agregada era muy estable considerando que la formulación que contiene un 35% de anfotericina B con los lípidos no se veía afectado por las diluciones del principio activo hasta concentraciones de $5 \cdot 10^{-8}$ M.

Wasan, E. K. y col., 2009, realizan un estudio de estabilidad de anfotericina B, administrada en formulaciones lipídicas junto con Peceol[®] (monooleato de glicerol), polietilenglicol y fosfolípidos, concretamente, la diestearoilfosfatidiletanolamina. Estos estudios, con una duración de 120 minutos y realizados en fluidos similares al medio gástrico y al medio intestinal, muestran un predominio del estado monomérico de la anfotericina B en un rango de concentraciones entre 1 y 15 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, los estados de agregación de la anfotericina B dependerán también de los disolventes empleados en las formulaciones. De este modo, Lincopan, N. y col., 2003, comprobaron que, cuando se empleaba agua como disolvente, la anfotericina B se encontraba en forma de poliagregado mientras que, al emplear una solución de dimetilsulfóxido y metanol, aparecía en forma monomérica. Las formulaciones de anfotericina B desarrolladas con el bromuro de dioctadecildimetilamonio (DODAB) por estos autores muestran un estado monomérico de la anfotericina B similar a la que presenta el principio activo cuando se administra en el solvente orgánico adecuado.

El bromuro de dioctadecildimetilamonio (DODAB) fue también utilizado por Vieira, D.B. y Carmona-Ribeiro, A.M., 2008. En este trabajo se indica que la anfotericina B como principio activo aparece en estado poliagregado cuando se encuentra en agua mientras que el estado monomérico aparece al emplear una solución de dimetilsulfóxido y metanol. En los estudios realizados por estos autores, las partículas de anfotericina B se incorporan en fragmentos bicapa de DODAB y carboximetilcelulosa (CMC) de manera que, cuando se elaboran las nanopartículas a baja presión, el principio activo se encuentra en estado monomérico. Sin embargo, cuando las nanopartículas se elaboran a presión elevada, el estado de agregación mayoritario de la anfotericina B es el poliagregado.

Otros autores como Adams, M. y Kwon, G.S., 2004, realizan el estudio del estado de agregación de formulaciones de anfotericina B que incluyen polímeros, concretamente el hexanoato de poli(óxido de etileno)-co-poli(*N*-hexil-L-aspartamida) y el estearato de poli(óxido de etileno)-co-poli(*N*-hexil-L-aspartamida).

Estas formulaciones desarrolladas por Adams, M. y Kwon, G.S., 2004, se reconstituyeron en agua, en metanol y en mezclas metanol/agua. En los espectros de absorción que se realizaron entre 320 y 450 nm se pudo observar que el estado de agregación de la anfotericina B formulada junto con hexanoato de poli(óxido de etileno)-co-poli(*N*-hexil-L-aspartamida, se encuentra

en forma monomérica al encontrarse disuelta en la solución metanol/agua 40/60 y en metanol puro mientras la incorporación del principio activo en agua induce la reorganización del principio activo en estado poliagregado.

Sin embargo, en el caso de la anfotericina B formulada con estearato de poli(óxido de etileno)-co-poli(*N*-hexil-L-aspartamida), la anfotericina B se presenta en forma monomérica en metanol. La incorporación de la formulación en una solución de metanol/agua en una proporción 40:60 el espectro muestra cuatro bandas de absorción. Tras la eliminación del metanol de las formulaciones y la encapsulación del principio activo en micelas en las que la relación de la anfotericina B/polímero es aproximadamente 1:3, aparece un único espectro de absorción en el que se estrechan las bandas de absorción y la longitud de onda máxima (389,5 nm) no se encuentra en el rango observado en los espectros de anfotericina B poliagregada. Estas características en el espectro de absorción de la anfotericina B indican que no predomina el estado poliagregado cuando el principio activo se formula en estearato de poli(óxido de etileno)-co-poli(*N*-hexil-L-aspartamida). Es más, la anfotericina B se presenta casi en el estado monomérico lo que puede ser debido a la interacción de las cadenas de estearato en agua.

Los ensayos de la determinación del tamaño de partícula resultan de gran interés no solamente por la importancia que tienen en la administración de los principios activos por vía parenteral sino también por la aplicación de determinados tratamientos a órganos diana mediante la vectorización de los mismos. No obstante, autores como Kaszuba, M. y col., 2008, consideran el estudio del tamaño de partícula como medida del proceso de control de calidad.

Las dimensiones de las partículas pueden ser determinadas con distintas técnicas como las técnicas de difracción de luz láser (Dynamic Light Scattering o DLS). En este trabajo, la determinación del tamaño de partícula se lleva a cabo en un Zetasizer Nano Malvern. Este sistema se basa en el movimiento browniano de las partículas que se encuentran en forma de solución o de

suspensión. Este movimiento se origina al hacer incidir un haz de luz en el medio líquido donde se encuentra las formulaciones objeto de estudio. Al incidir el haz de luz en las partículas, ésta se desvía 173° y es recibida por el detector. De este modo, el sistema evita las interferencias de las partículas contaminantes ya que éstas hacen incidir la luz hacia delante.

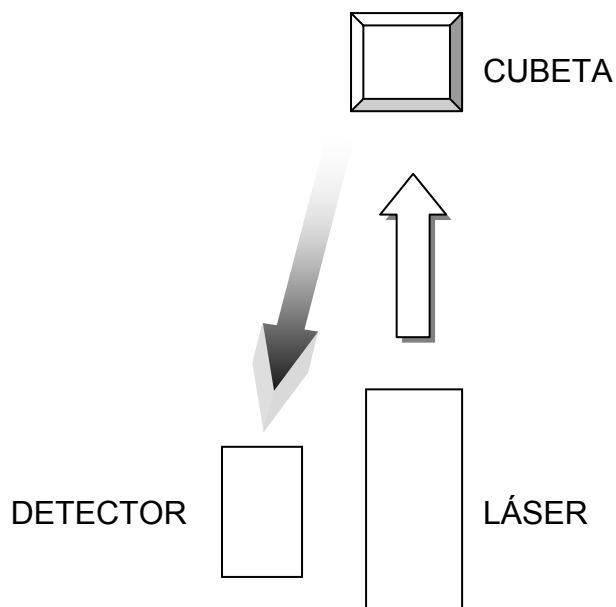


Figura 1.- Esquema del espectrofotómetro Zetasizer Nano Malvern de difracción de luz láser.

Si bien los sistemas convencionales refractan la luz a 90°, el hecho de que el Zetasizer Nano permita las lecturas a 173° permite una lectura más sensible para las partículas de pequeño tamaño como indican Kaszuba, M. y col., 2008.

El tamaño de las partículas es determinado por el movimiento browniano de las partículas al incidir el haz de luz sobre ellas. El cálculo de dicho parámetro, tiene como fundamento la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = K \cdot T / f$$

Donde:

D es el coeficiente de difusión.

K es la constante de Boltzmann.

T corresponde a la temperatura.

f es el coeficiente de fricción de la esfera compacta en un medio viscoso, es dependiente del radio de la partícula (R_H) y de la viscosidad (η). El coeficiente de fricción es conocido a través de la expresión:

$$f = 6 \pi \eta R_H$$

El radio de la partícula obtenido a partir del DLS es el radio de una esfera compacta hipotética que difunde la luz a la misma velocidad que las partículas objeto de estudio.

La polidispersabilidad del tamaño de partícula permite determinar el rango de tamaño de las partículas y, de este modo, conocer si el tamaño de las partículas se ajusta a un solo valor, es decir, son monodispersas o si, por el contrario, las partículas presentan distintos tamaños de partículas. En relación a los índices de polidispersabilidad (PDI), los valores entre 0,08 y 0,7 de PDI establecen el intervalo adecuado para este parámetro. Valores superiores a 0,7 implican una elevada polidispersabilidad mientras que valores inferiores a 0,08 implican que las muestras son monodispersas.

Diversos autores han desarrollado vectores para la administración parenteral de anfotericina B entre los que destacan las nanopartículas, las micelas poliméricas y los polisacáridos hidrofóbicos por sus características de unión en medio acuoso (Choi, K.C. y col., 2008). Estos nanovectores con propiedades de autoensamblaje presentan generalmente un núcleo hidrofóbico y una envoltura o cubierta con características hidrofílicas cuyo tamaño es uno de los factores determinantes para la vectorización del fármaco. Así por ejemplo Choi, K.C. y col., 2008 realizan el estudio del tamaño de la partícula de micelas poliméricas de anfotericina B y copolímero poli(D,L-láctico-co-

glicólico)/dextrano mediante espectroscopía de correlación fotónica. Éstas presentan tamaños medios que no exceden los 200 nm dependiendo de la proporción que exista entre la micela polimérica y la anfotericina B. En este estudio se observa que, aún en las mayores proporciones de anfotericina B (18,9% p/p) y donde la proporción de micela polimérica:anfotericina B es de 40:10, los tamaños de partícula son de sólo $124,5 \pm 80,8$ nm.

Espada, R. y col., 2008a, estudian el tamaño de partícula en anfotericina B en forma monomérica, dimérica y poliagregada. El tamaño de estas partículas se comparó con la formulación comercial Fungizona[®] empleando el tamaño hidrodinámico medio. La forma dimérica presenta un tamaño de $11,9 \pm 3,2$ nm y un estado de agregación similar es obtenido con la Fungizona[®] que, sin embargo, presenta tamaños superiores de partícula ($138,7 \pm 41,2$ nm). La forma poliagregada es la que presenta mayores tamaños hidrodinámicos medios ($1692,1 \pm 615,5$ nm).

Espuelas, M.S. y col., 2003, estudian formulaciones de anfotericina B en forma tanto de nanopartículas como de mezclas micelares. Las nanopartículas, constituidas por anfotericina B, poli(ϵ -caprolactona) y poloxamer 188 presentan menores tamaños de partícula, con valores de 282 ± 50 nm, mientras que las micelas, formuladas con anfotericina B y poloxamer 188, presentan mayores tamaños de partícula (358 ± 62 nm). En este mismo trabajo se indica que las dispersiones acuosas de anfotericina B en un estado poliagregado presentan elevados tamaños de partícula (superior a 1000 nm).

Larabi, M. y col., 2004 formulan la anfotericina B junto con fosfolípidos, concretamente el dimiristoilfosfatidilglicerol y la dimiristoilfosfatidilcolina. En este estudio, se muestra también un tamaño inicial de partícula de la anfotericina B superior a 1000 nm en dispersión acuosa y valores elevados de polidispersabilidad (0,68). Sin embargo, las micelas lipídicas óptimas, donde la anfotericina B constituye el 35% del peso total de los fosfolípidos, mostraron tamaños de partícula óptimos (303 ± 53 nm) y valores mínimos de polidispersabilidad (0,16). Es importante destacar que, en este trabajo, se

muestran porcentajes del 13 y 7% de partículas de elevado tamaño (> 1000 nm) en algunas formulaciones lipídicas en las que las proporciones de anfotericina B son del 45 y 50% del peso total respecto a los fosfolípidos.

Vieira, D. B. y Carmona-Ribeiro, A. M., 2008, observan que el tamaño de las nanopartículas depende las proporciones de carboximetilcelulosa sódica (CMC) y está condicionado por las concentraciones de anfotericina B y del bromuro de dioctadecil dimetil amonio (DODAB). Así, para concentraciones de anfotericina B y DODAB de 0,005 y 1 mM respectivamente, los tamaños de partícula son de 88 ± 1 y 90 ± 2 nm al presentar concentraciones de 0,01 y 1 mg/dl de CMC mientras que, con concentraciones de CMC intermedias (0,1 mg/dl), el tamaño de partícula obtenido es de 145 ± 1 nm. Al emplear concentraciones de 0,05 y 0,1 mM de anfotericina B y DODAB respectivamente, se observa el mismo efecto en el tamaño de partículas de manera que las concentraciones superiores e inferiores de CMC (0,001 y 0,1 mg/dl) permiten obtener los menores tamaños de partícula (199 ± 1 y 230 ± 2 nm respectivamente) mientras que las concentraciones intermedias de CMC (0,01 mg/dl) presentan tamaños de 1280 ± 80 nm.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- Materiales.

2.1.1.- Productos y reactivos.

La anfotericina B (AMB) y la especialidad farmacéutica comercializada Fungizona[®], constituida por anfotericina B y desoxicolato de sodio, fueron suministradas por Bristol Myers, Squibb (Barcelona, España). El Ambisome[®], constituido por liposomas compuestos de anfotericina B: fosfatidilcolina: colesterol: diestearoilfosfatidilglicerol 50:213:52:84 p/p/p/p) fue suministrado por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).

El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemie A.G. (Buchs, Suiza). El dimetilsulfóxido (DMSO) así como el ácido acético glacial fueron obtenidos de Panreac S.A. (Barcelona, España). El acetonitrilo y el metanol, ambos con grado HPLC, se obtuvieron de Labscan (Dublín, Irlanda). El agua purificada estéril fue obtenida por un sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

2.2.- Métodos.

2.2.1.- Método de elaboración de las formulaciones liofilizadas de anfotericina B y desoxicolato de sodio.

Las formulaciones objeto de estudio presentan en su composición anfotericina B y desoxicolato de sodio en las que se mantiene constante la proporción de anfotericina B mientras que la proporción de desoxicolato de sodio es variable, oscilando entre 0 y 8 (p/p). De este modo, las formulaciones elaboradas presentan unas proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio de 1:0; 1:0,8; 1:1,5; 1:2; 1:4 y 1:8 (p/p).

No obstante, y con el fin de poder comparar las formulaciones, se elaboran formulaciones control con proporciones similares de desoxicolato de sodio pero sin anfotericina B. Las formulaciones empleadas como control presentan proporciones de anfotericina B: desoxicolato de sodio 0:0,8; 0:1,5; 0:2; 0:4 y 0:8 (p/p).

La elaboración de las formulaciones se lleva a cabo tras la disolución del desoxicolato de sodio en agua purificada estéril. Se procede a continuación a la adición de la anfotericina B en la disolución del desoxicolato de sodio de manera que se obtengan formulaciones con una proporción constante de anfotericina B pero variable de desoxicolato de sodio.

Las suspensiones se mantienen en agitación durante dos minutos a 2200 rpm. Estas suspensiones correspondientes a cada una de las formulaciones fueron sometidas a un proceso de congelación a -20° C y, posteriormente, a un proceso de liofilización por vacío.

2.2.2.- Estudio morfológico de las distintas formulaciones.

La morfología de las formulaciones obtenidas y de las formulaciones comerciales empleadas como control (Fungizona[®] y Ambisome[®]) se realiza mediante microscopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy (SEM); JEOL, JSM-6335-F, Tokio, Japón).

2.2.3.- Determinación del tamaño de partícula y del índice de polidispersabilidad (PDI).

El tamaño de partícula y el índice de polidispersabilidad se determinan en las formulaciones liofilizadas en las que las proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio son 1:0; 1:0,8; 1:1,5; 1:2; 1:4 y 1:8 (p/p). Las formulaciones control empleadas en este estudio fueron la Fungizona[®] y una

formulación blanco de desoxicolato de sodio donde la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio es de 0:8 (p/p).

La medición del tamaño de partícula se realizó en un equipo de espectrofotometría de difracción de luz láser (Dynamic Light Scattering o DLS Zetasizer Nano Malvern) tras la suspensión de los liofilizados en agua purificada (Tiyaboonchai, W. y Limpeanchob, N., 2007). Sus dimensiones se expresan como el diámetro medio en función de la intensidad (Chen, W. y col., 2008).

2.2.4.- Determinación del estado de agregación.

El estado de agregación de las formulaciones se estudia mediante su suspensión en agua purificada y su posterior análisis en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 en un rango de longitudes de onda de 300 a 450 nm (Espada, R. y col., 2008a y Sánchez-Brunete, J. A. y col., 2004).

Como controles para este estudio se emplean la Fungizona[®], con la anfotericina B en forma dimérica, y el AmBisome[®], en el que el principio activo aparece como una mezcla de estados de agregación (Espada, R. y col., 2008a). Además el estado monomérico de la anfotericina B se obtiene al diluir el principio activo en una solución de dimetilsulfóxido: metanol en proporción 1:1.

2.2.5.- Análisis de la anfotericina B por HPLC en muestras biológicas.

Se realiza una puesta a punto de una técnica analítica de HPLC para distintas muestras biológicas de ratones (plasma, bazo, hígado y riñones). Este estudio se realiza con la finalidad de relacionar el estado de agregación de las distintas formulaciones con la concentración de anfotericina B que se llega a alcanzar en estos órganos a las 24 horas post-administración. El ensayo se lleva a cabo con ratones machos ICR (25-30 g) después de un periodo de aclimatación de 7 días. Los animales se mantienen durante el tiempo de

experimentación en jaulas de plástico con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas en el laboratorio de experimentación animal de la Universidad Complutense de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva 86/609/EU de la legislación de la Unión Europea. Las formulaciones comerciales y dosis administradas fueron: Fungizona[®], administrada en dosis de 1 mg/kg y AmBisome[®], administrado en dosis de 5 mg/kg.

En el caso de las formulaciones objeto de estudio (AMB:DCH 1:0; AMB:DCH 1:0,8; AMB:DCH 1:1,5) se evalúan a tres dosis diferentes (1 mg/kg; 3 mg/kg y 5 mg/kg).

2.2.5.a.- Condiciones cromatográficas.

Se sigue la técnica de Espada, R. y col., 2008b, en las condiciones que se mencionan a continuación:

1. Columna de fase reversa Thermo Hypersil BDS C₁₈ de 5 µm de diámetro interno y 250 x 4,6 mm.
2. Fase móvil:
 - a. Flujo: 1 ml/min.
 - b. Composición de la fase móvil: acetonitrilo: ácido acético glacial: agua en proporción 52: 4,3: 43,7 (v/v/v).
 - c. Volumen de inyección: 100 µl.
 - d. Detector, empleado a una longitud de onda de 406 nm.

2.2.5.b.- Preparación de las muestras patrón.

Se pesa exactamente una cantidad aproximada de unos 5 mg de anfotericina B que es llevada a un matraz aforado de 250 ml. Se añaden alrededor de 100 ml de metanol y se somete a agitación en vórtex (2200 rpm) hasta la total disolución. A continuación se procede a enrasar con metanol a 250 ml. Una vez obtenida la disolución madre, ésta se somete de nuevo a agitación durante 3 minutos a 2200 rpm.

A partir de esta solución madre se preparan y analizan las soluciones de 0,020; 0,060; 0,200; 0,500; 1; 1,5; 2 y 5 µg/ml. Las muestras se filtran un filtro Millipore HVLP de 0,45 µm.

El tiempo de retención de la anfotericina B en las muestras es de 8-10 min (Figura 2).

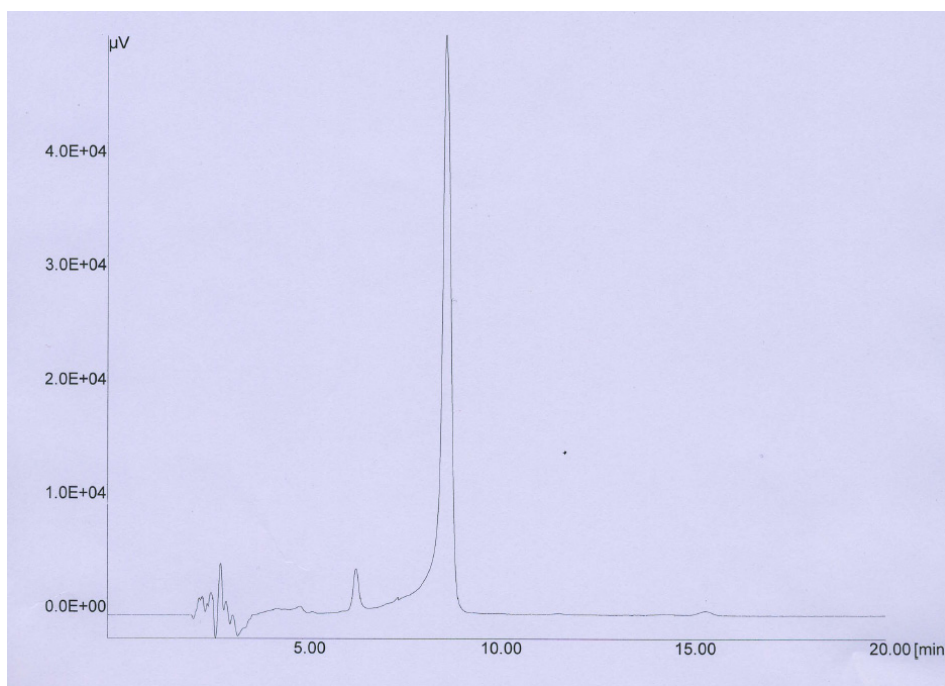


Figura 2.- Cromatograma representativo de la anfotericina B en metanol:agua (MeOH:H₂O).

La recta de calibrado cumple la ley de Lambert-Beer y se ajusta a siguiente ecuación:

$$\text{ÁREA} = - 112908,302 + 585424,48 \times C \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$r^2 = 0,98979$$

$$n = 8$$

Rango: 0,02 - 5 µg/ml.

A pesar de que los puntos se ajustan a la recta de calibrado anteriormente mencionada, se comprobó que cuando se trabaja con las concentraciones más bajas de anfotericina B aparecen mayores desviaciones respecto a los valores teóricos. La elaboración de una segunda recta de calibrado con intervalos de concentraciones más bajos (0,020 µg/ml a 0,5 µg/ml) permite un mejor ajuste a bajas concentraciones de anfotericina B:

$$\text{AREA} = - 5522,594 + 365428,944 \times C(\mu\text{g/ml})$$

$$r^2 = 0,9994$$

$$n = 4$$

Rango: 0,02 - 0,5 µg/ml.

2.2.5.c.- Análisis de anfotericina B en las muestras plasmáticas.

Preparación de las muestras plasmáticas.

Se recogen las muestras de sangre de los ratones ICR en tubos Pyrex previamente heparinizados. A continuación, se procede a la centrifugación de la sangre a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener las muestras plasmáticas. Estas muestras de plasma se mantienen a -20°C, hasta su análisis.

De cada muestra, una vez descongelada, se toma una alícuota de 200 µl de plasma a los que se les añaden 2 ml de metanol, para la precipitación de proteínas. Los tubos se agitan en un agitador de tubos durante 30 segundos a 1800 rpm y, posteriormente, se centrifugan durante 10 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se analiza por cromatografía de líquidos de alta resolución tras haber sido filtrado a través de un filtro Millipore Millex de 0,45 µm.

Análisis de las muestras de anfotericina B.

El tiempo de retención de las muestras es de 8-10 min. La figura 3 recoge un cromatograma representativo de anfotericina B de una de las muestras plasmáticas.

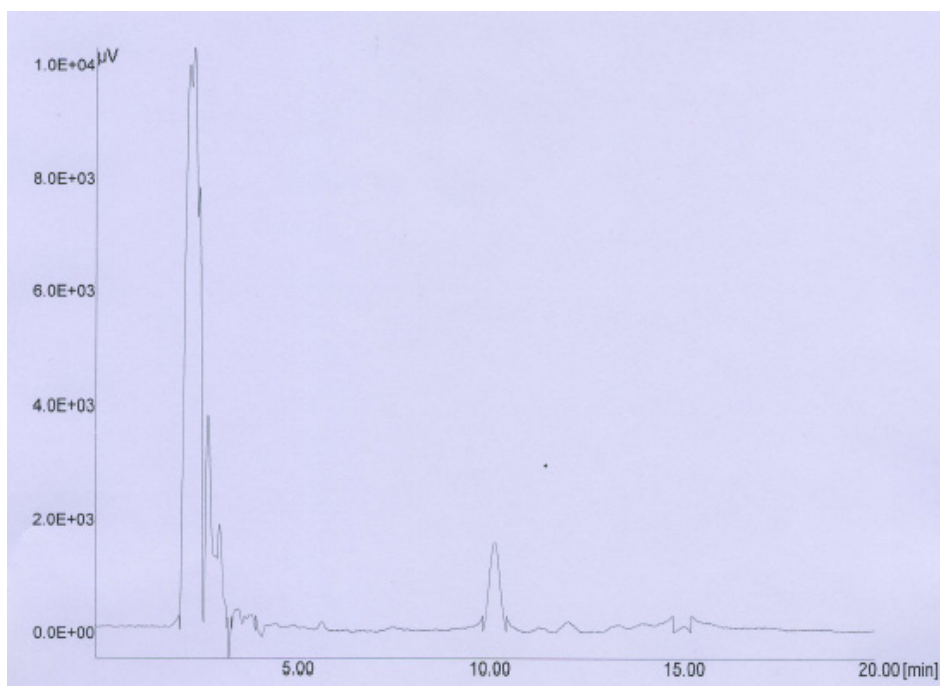


Figura 3.- Cromatograma representativo de la anfotericina B en plasma.

2.2.5.d.- *Análisis de anfotericina B en las muestras esplénicas.*

Preparación de las muestras.

Una vez sacrificados los ratones, se procede a la extracción del bazo, y se homogenizan con 0,3 ml de agua purificada. Las muestras se almacenan a -20°C hasta el momento del análisis.

Tras la descongelación de las muestras homogenizadas se les añaden 1,5 ml de metanol, para la precipitación de proteínas, se someten a agitación a

1800 rpm durante 2 minutos y, a continuación, se centrifugan a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante es filtrado a través de un filtro Millipore Millex de 0,45 μm .

Análisis de las muestras de anfotericina B.

El tiempo de retención de las muestras es de 8-10 minutos. La figura 4 recoge un cromatograma representativo de anfotericina B en una muestra esplénica.

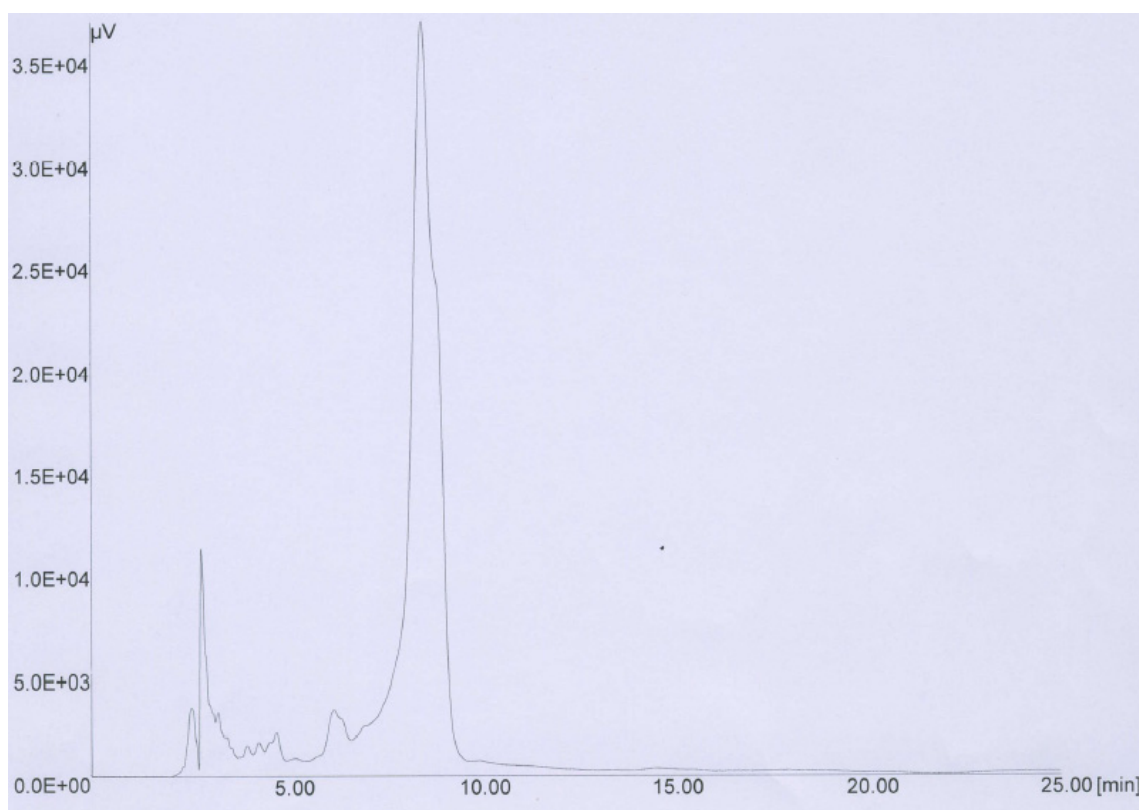


Figura 4.- Cromatograma representativo de la anfotericina B en el bazo.

2.2.5.e.- Análisis de anfotericina B en las muestras hepáticas.

Preparación de las muestras.

Una vez sacrificados los ratones, se procede a la extracción del hígado, y se homogeniza con 1,0 ml de agua purificada. Las muestras se almacenan a -20°C hasta el momento del análisis.

Tras la descongelación de las muestras homogenizadas se les añaden 1,5 ml de metanol, para la precipitación de proteínas, se someten a agitación a 1800 rpm durante 2 minutos y, a continuación, se centrifugan a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante es filtrado a través de un filtro Millipore Millex de 0,45 µm.

Análisis de las muestras de anfotericina B.

El tiempo de retención de las muestras es de 8-10 minutos. La figura 5 recoge un cromatograma representativo de anfotericina B de una de las muestras hepáticas.

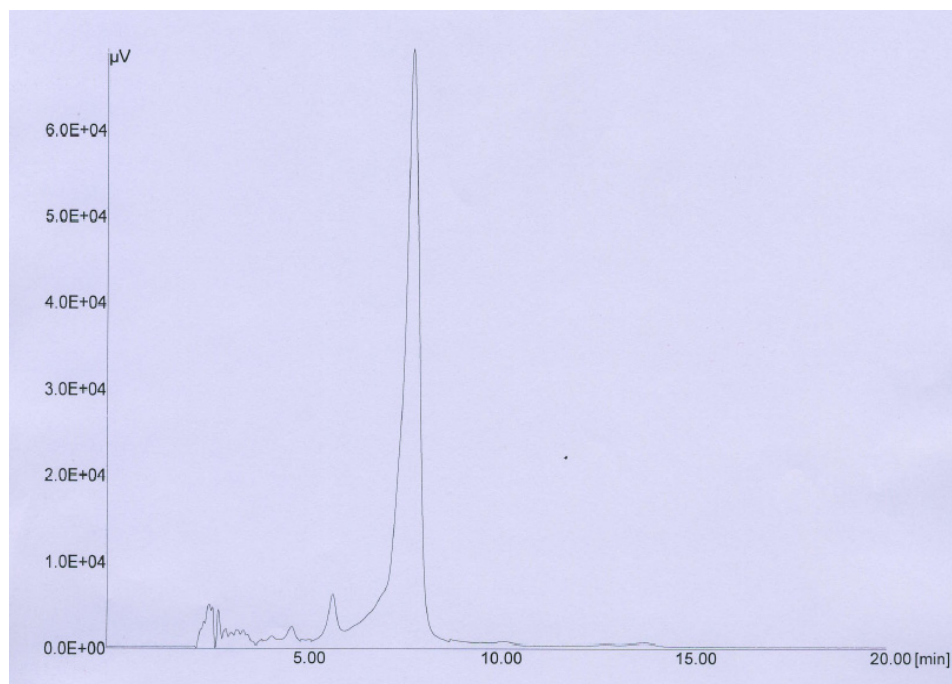


Figura 5.- Cromatograma representativo de la anfotericina B en hígado.

2.2.5.f.- Análisis de anfotericina B en las muestras renales.

Preparación de las muestras.

Una vez sacrificados los ratones, se procede a la extracción de los riñones, y se homogenizan con 0,5 ml de agua purificada. Las muestras se almacenan a -20° C hasta el momento del análisis.

Tras la descongelación de las muestras homogenizadas se les añaden 1,5 ml de metanol, para la precipitación de proteínas, se someten a agitación a 1800 rpm durante 2 minutos y, a continuación, se centrifugan a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante es filtrado a través de un filtro Millipore Millex de 0,45 μm.

Análisis de las muestras de anfotericina B.

El tiempo de retención de las muestras es de 8-10 minutos. La figura 6 presenta un cromatograma representativo de anfotericina B a nivel renal.

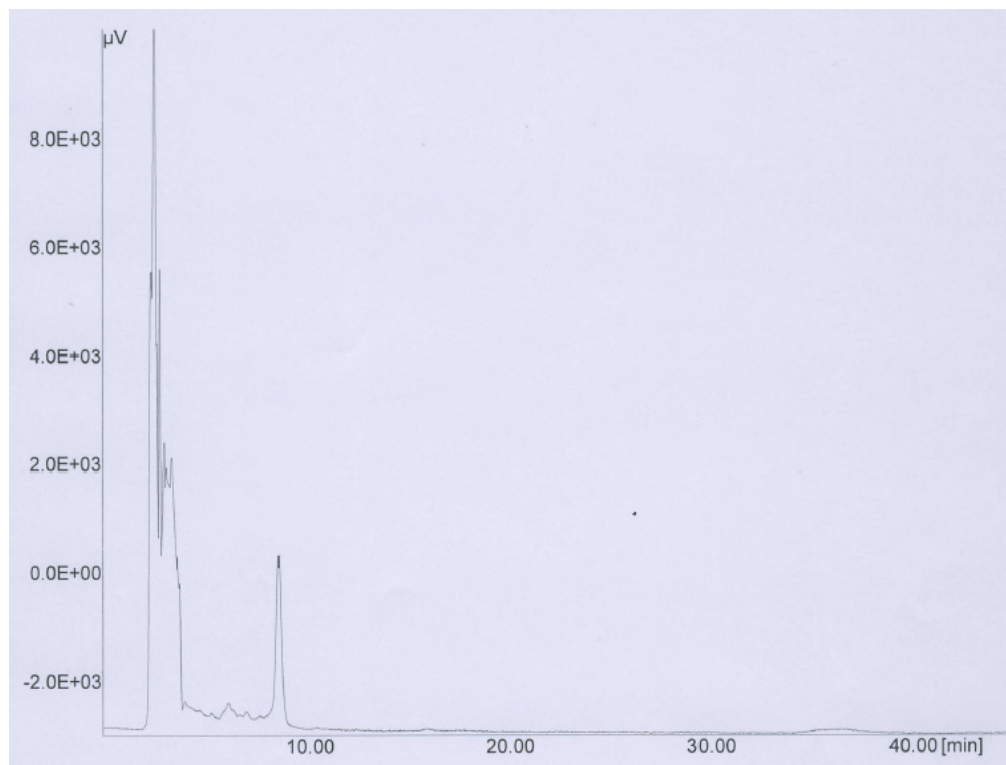


Figura 6.- Cromatograma representativo de la anfotericina B en riñones.

En los cromatogramas de muestras de plasma, bazo, hígado y riñones se observa la aparición de un pico nítido de anfotericina B, sin que exista interferencia con proteínas u otras sustancias que puedan interferir en su análisis.

3.- RESULTADOS.

3.1.- Estudio del estado de agregación de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio.

La necesidad de reconstituir las formulaciones inmediatamente antes de la realización de los estudios farmacotécnicos se debe a la facilidad del principio activo a agregarse como demuestra Ranchère, J.Y. y col., 1996 mediante la determinación del aumento de tamaño de las partículas de las formulaciones de anfotericina B, administrada como Fungizona[®], conjuntamente con una emulsión lipídica para infusión a las 3 y a las 24 horas tras su elaboración.

La posibilidad de agregación de las moléculas de anfotericina B es un factor condicionante en los tratamientos por vía sistémica a los pacientes de tal forma que Espuelas, M.S. y col., 2003, consideran que la anfotericina B en su estado poliagregado está relacionado con efectos secundarios relacionados con la infusión y que la precipitación del principio activo origina obstrucciones en los túbulo renales.

Los espectros *UV-VIS* permiten conocer el estado de agregación mayoritario que presenta cada formulación. Estos estados de agregación pueden confirmar los datos obtenidos en la microscopía electrónica y serán útiles para el posterior estudio del tamaño de partícula.

Con el fin de determinar el estado de agregación de la anfotericina B en las nuevas formulaciones, se analizaron previamente los barridos de absorción de:

- Anfotericina B disuelta en una mezcla de metanol y dimetilsulfóxido 1:1 como ejemplo de forma monomérica (0,6 µg/ml)
- Fungizona® reconstituida con agua purificada como ejemplo de forma dimérica (10 µg/ml)
- AmBisome® reconstituido con agua purificada (5 µg/ml)
- Anfotericina B dispersada en agua purificada (15 µg/ml)
- Anfotericina B dispersada en agua purificada tras su liofilización previa (anfotericina B:desoxicolato de sodio 1:0) (15 µg/ml).

Estos barridos de absorción de las distintas muestras se muestran en la figura 7.

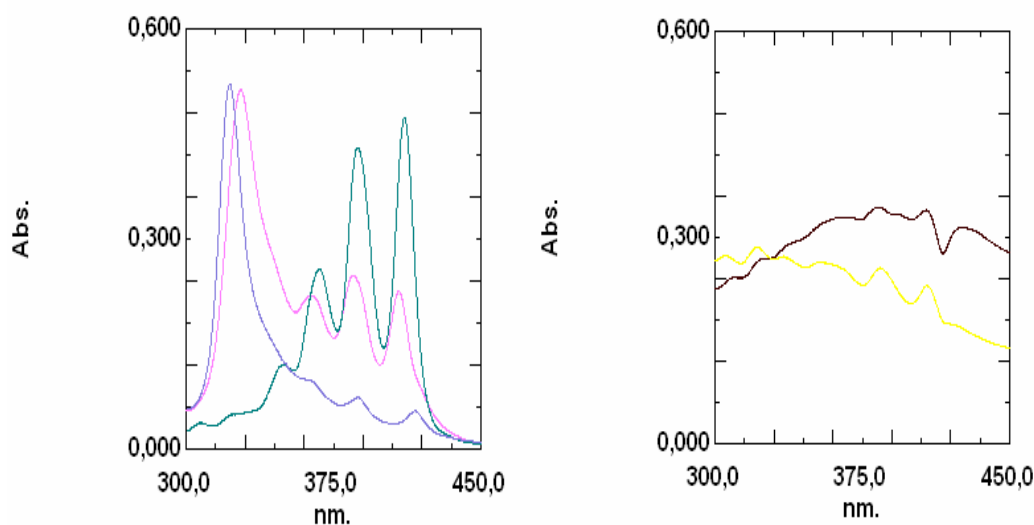


Figura 7.- Estado de agregación de Fungizona® (■), AmBisome® (■), anfotericina B monomérica (■), anfotericina B materia prima (■) y anfotericina B:desoxicolato de sodio 1:0 (■).

Como se puede observar en la figura 7, la muestra de anfotericina B disuelta en una mezcla de metanol y dimetilsulfóxido presentó claramente los máximos de absorción característicos de las formas monoméricas de anfotericina B (406 nm; 383 nm y 363 nm). La muestra de Fungizona®

reconstituida presentó un máximo a 326 nm lo que concuerda con una forma dimérica de anfotericina B (Sánchez-Brunete, J.A. y col., 2004). Por otra parte, la muestra de AmBisome[®] presenta una mezcla de estados de agregación al igual que lo observado por Espada, R y col., 2008. Finalmente, la anfotericina B materia prima y la formulación que solo contiene anfotericina B liofilizada presenta un estado poliagregado del fármaco.

En la figura 8 se recogen los barridos de absorción tanto de las formulaciones comerciales reconstituidas Fungizona[®] y AmBisome[®] como de las nuevas formulaciones liofilizadas de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporciones 1:0,8 (10 µg/ml); 1:1,5 (5 µg/ml); 1:2 (7 µg/ml); 1:4 (7 µg/ml) y 1:8 (15 µg/ml).

En la formulación liofilizada que presenta una proporción de anfotericina B:desoxicolato de sodio, 1:0,8 se aprecia la presencia de un primer máximo a 330 nm de poca intensidad y la existencia de una meseta con máximos característicos en la zona de 360 a 420 nm. Estos resultados indican la presencia en esta formulación de una estructura mayoritariamente poliagregada y una pequeña parte dimérica. En esta misma figura 8 se puede observar que con proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio 1:1,5 o superiores disminuye el máximo a 330 nm, correspondiente a la forma dimérica, excepto en la formulación de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:2 en cuyo barrido este máximo de absorbancia a 330 nm vuelve a mostrarse de forma acusada.

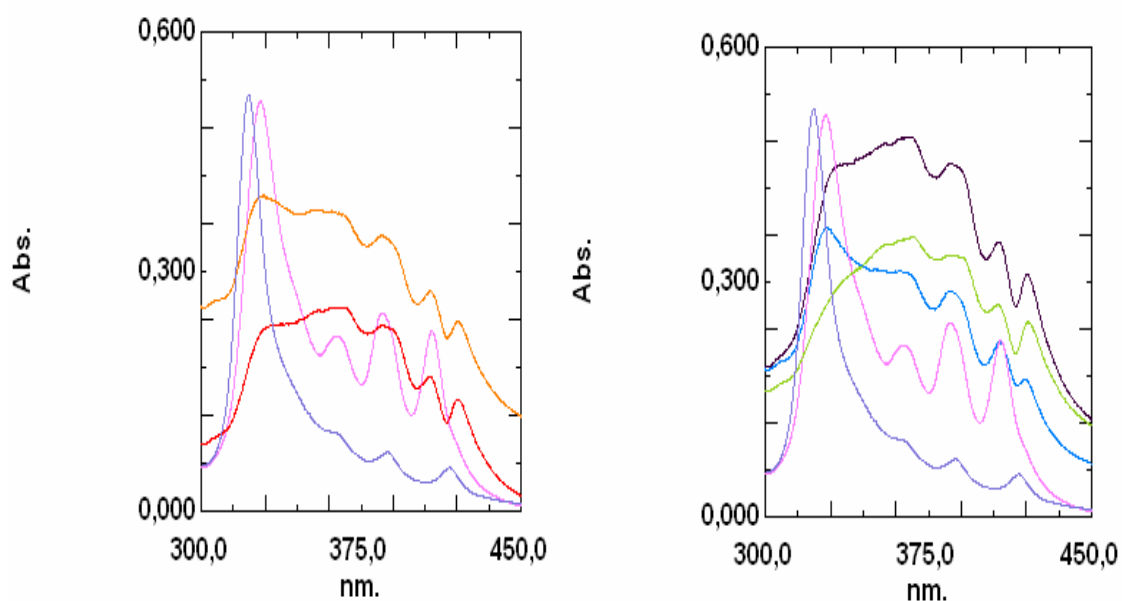


Figura 8.- Estados de agregación de Fungizona® (■) y AmBisome® (■) frente a las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio liofilizados en proporción 1:0,8 (■), 1:1,5 (■), 1:2 (■), 1:4 (■) y 1:8 (■).

3.2.- Estudio morfológico de las partículas de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio.

Los estudios de la morfología, desarrollados con técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM; Jeol 6400, Tokio, Japón), muestran que la anfotericina B (Figura 9a) presenta una superficie escamosa con tamaños inferiores a 10-15 μm y pequeñas partículas adheridas en su superficie. Sin embargo, el desoxicolato de sodio empleado como materia prima en nuestras formulaciones (Figura 9b) se encuentra en forma cristalina, con tamaños mayores, entre 20 y 40 μm , y con una superficie lisa.

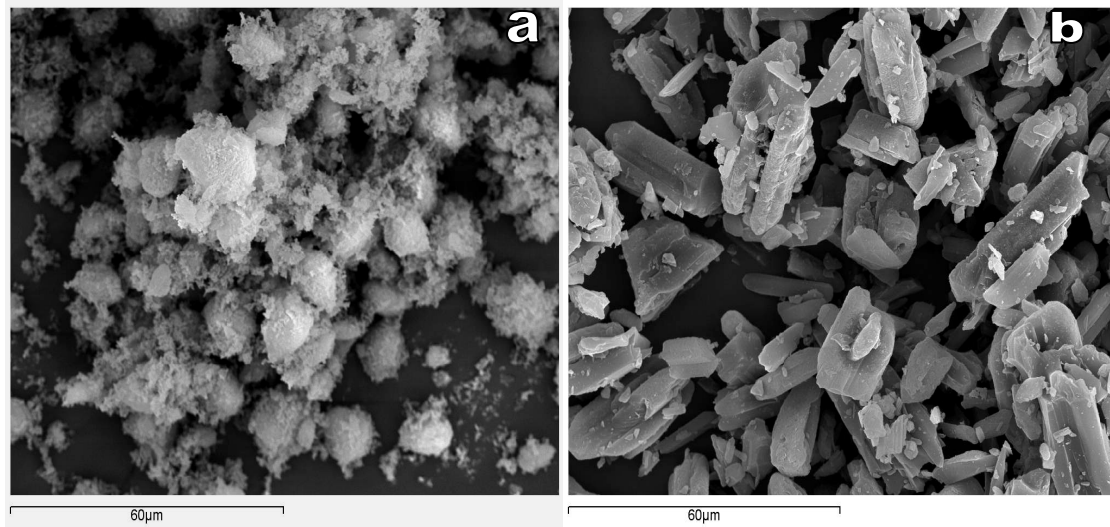


Figura 9.- Microfotografías de las materias primas, anfotericina B (a) y desoxicolato de sodio (b). El aumento corresponde a 1000X y la escala a 60 μm .

En la figura 10 se pueden observar las microfotografías de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio obtenidas.

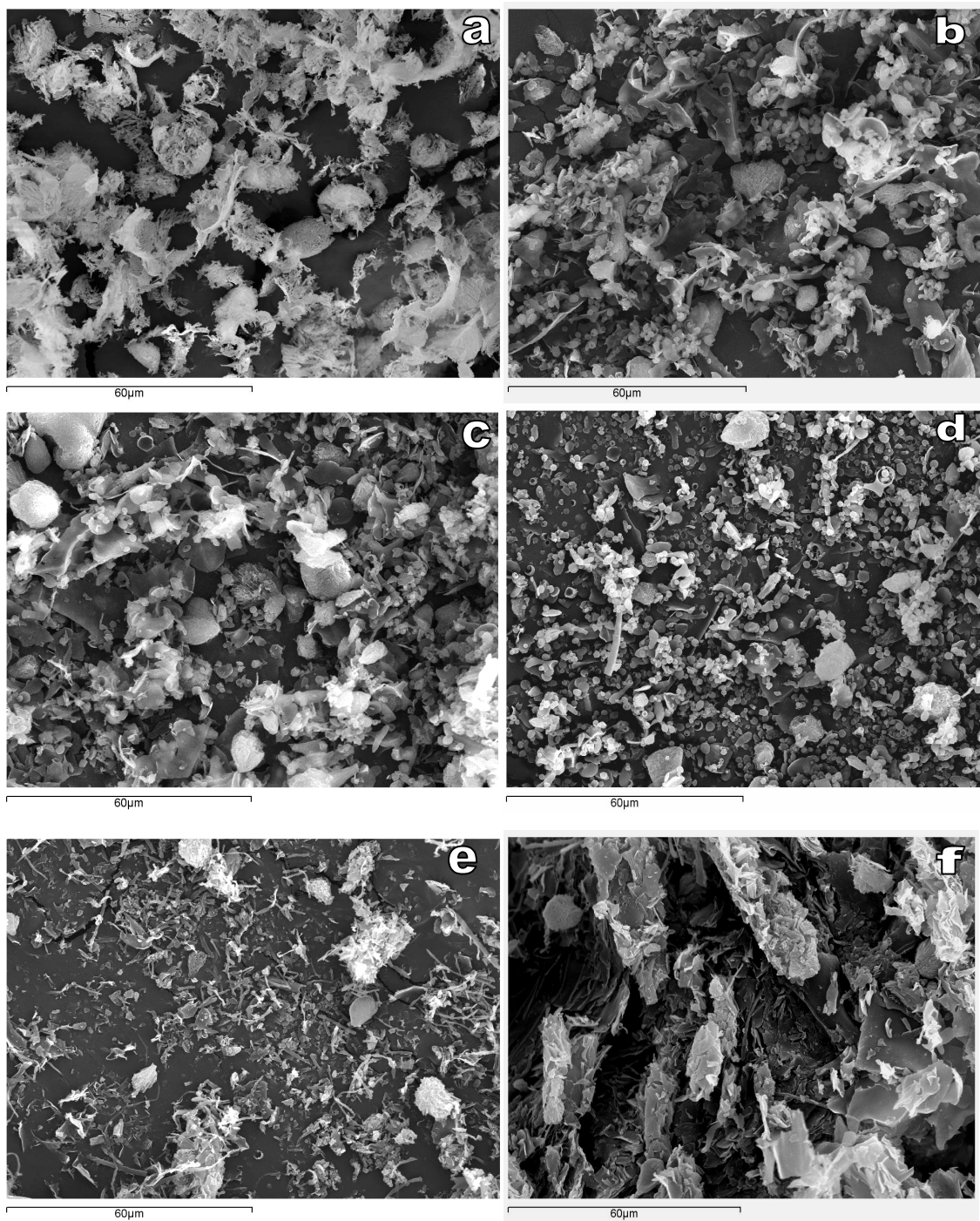


Figura 10.- Microfotografías de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:0 (a), 1:0,8 (b), 1:1,5 (c), 1:2 (d), 1:4 (e) y 1:8 (f). El aumento corresponde a 1000X y la escala a 60 µm.

En la Figura 10a se pueden observar algunas partículas esféricas de 10-15 μm de anfotericina B similares a las observadas en la materia prima (Fig. 9a) y una gran cantidad de estructuras irregulares laminares y esponjosas que corresponden a la rotura de estas mismas partículas debida al proceso de liofilización.

En las figuras 10b y 10c se aprecian dos poblaciones de partículas esféricas de dos tamaños 1,5 μm y 7 μm correspondientes a la anfotericina B y estructuras escamosas de mayor tamaño (30 μm) correspondientes al desoxicolato de sodio. En la figura 10d prácticamente todas las partículas de anfotericina B se corresponden con la población de menor tamaño. En las figuras 10e y 10f es difícil identificar la presencia de las partículas esféricas de anfotericina B ya que las fotografías muestran mayoritariamente las partículas de desoxicolato de sodio. Las diferencias en los tamaños existentes entre las formulaciones liofilizadas concuerdan con los resultados obtenidos en la espectrofotometría de forma que la población de anfotericina B de menor tamaño se relaciona con la aparición de un máximo de absorbancia a 330 nm que es especialmente alto en el caso de la formulación anfotericina B: desoxicolato de sodio 1:2 ver figuras 8 y 10d. Cuando se comparan las microfotografías correspondientes a las formulaciones 1:0,8 y 1:1,5 se aprecia una mayor población de partículas pequeñas en la formulación 1:0,8 que nuevamente vuelve a corresponderse con un mayor valor de absorción a 330 nm.

Cuando el desoxicolato sódico se encuentra en las proporciones mayores, como ocurre en la formulación de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:8 (Figura 10f), se observan estructuras de mayor tamaño de desoxicolato de sodio posiblemente como resultado del proceso de agregación durante la etapa de liofilización.

Este fenómeno de agregación fue comprobado al liofilizar formulaciones blanco sin anfotericina B (Fig. 11), en las que se aprecian mayores tamaños de las estructuras de desoxicolato de sodio cuando las muestras están más

concentradas en este componente como se puede observar claramente en las figuras 11 y 11e.

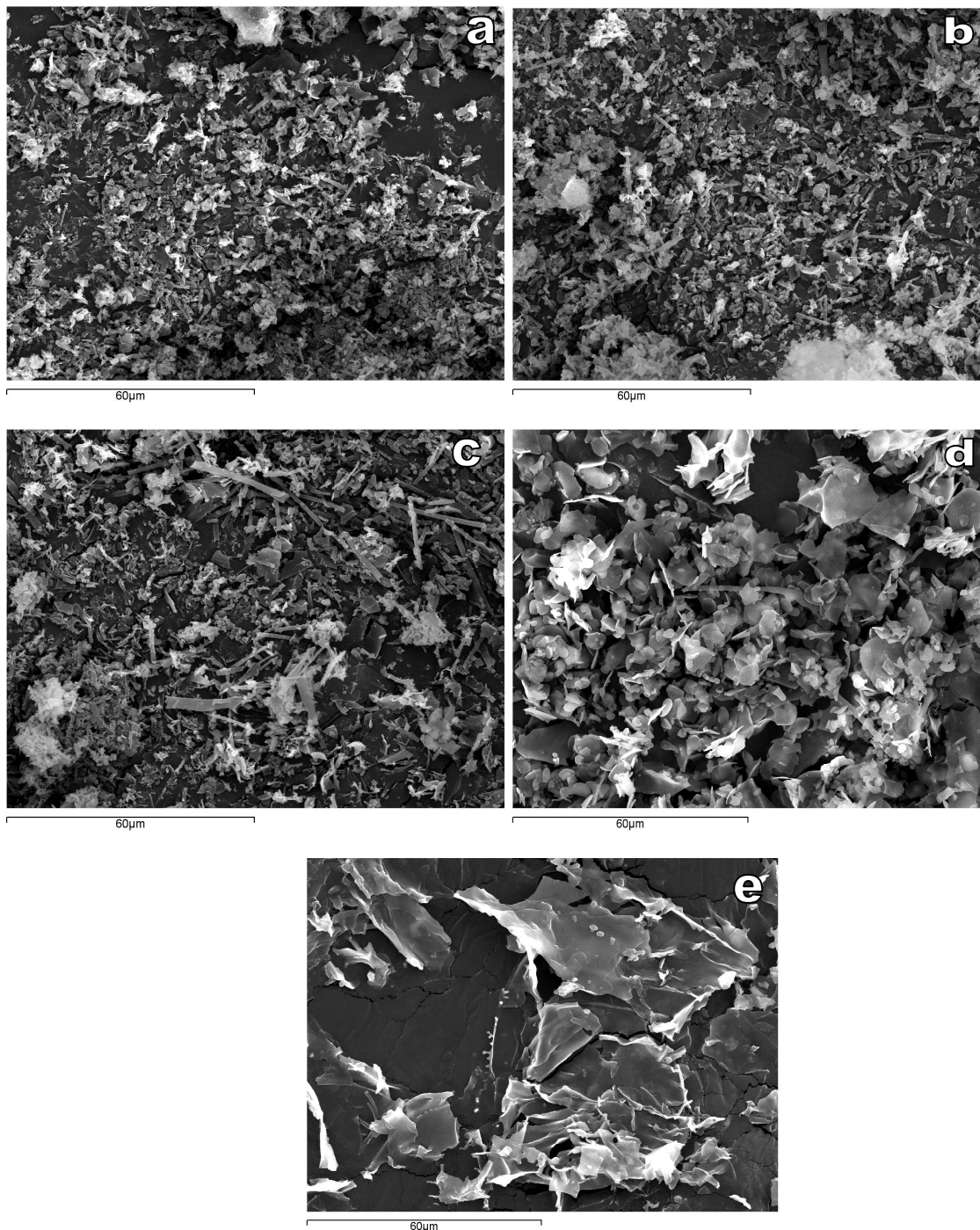


Figura 11.- Microfotografías de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 0:0,8 (a), 0:1,5 (b), 0:2 (c), 0:4 (d) y 0:8 (e). El aumento corresponde a 1000X y la escala a 60 µm.

En la figura 12 se muestran las estructuras de las partículas de las formulaciones comerciales AmBisome[®] y Fungizona[®] en las que se aprecian partículas poliédricas y laminares respectivamente. La diferencia morfológica de estas formulaciones con las obtenidas en este trabajo, se debe atribuir tanto al procedimiento de obtención de las mismas como a su diferente composición, ya que por ejemplo la Fungizona[®] incluye entre sus excipientes además del desoxicolato sódico, fosfato disódico y fosfato sódico monobásico.

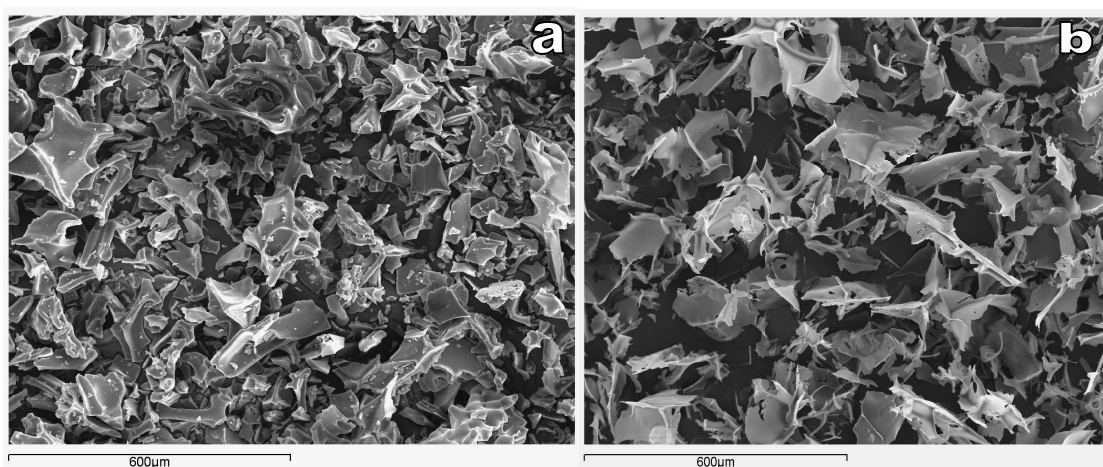


Figura 12.- Microfotografía de las formulaciones comercializadas AmBisome[®] (a) y Fungizona[®] (b). El aumento corresponde a 100X y la escala 600 μm .

3.3.- Estudio del tamaño de partícula y del índice de polidispersabilidad (PDI).

Los resultados obtenidos en la determinación del tamaño de partícula y del índice de polidispersabilidad de las muestras suspendidas en agua se muestran en la Tabla 1.

FORMULACIONES	ÍNDICE DE POLIDISPERSABILIDAD (PDI)	TAMAÑO MEDIO DE PARTÍCULA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR (nm) (%)	
FUNGIZONA [®]	0,42	56,2 ± 4,3 (98,3%)	3975,0 ± 374,8 (1,7%)
AMB:DCH 0:8	0,38	1,3 ± 0,1 (64,6%)	257,6 ± 28,4 (32,1%)
AMB:DCH 1:0	0,56	1280,0 ± 216,0 (79,9%)	5340,0 ± 216,5 (12,1%)
AMB:DCH 1:0,8	0,57	734,0 ± 157,3 83,4%	143,5 ± 23,5 (16,6%)
AMB:DCH 1:1,5	0,32	444,8 ± 61,1 (96,9%)	4997,5 ± 465,5 (3,1%)
AMB:DCH 1:2	0,39	447,2 ± 46,7 (91,7%)	4378,0 ± 457,8 (8,3%)
AMB:DCH 1:4	0,56	457,2 ± 17,2 (81,0%)	5217,5 ± 198,0 (8,9%)
AMB:DCH 1:8	0,44	333,8 ± 96,3 (86,9%)	4654,0 ± 313,3 (13,0%)

Tabla 1.- Valores de tamaño de partícula y del índice de polidispersabilidad de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio (AMB:DCH) y de la formulación comercializada Fungizona[®].

Las formulaciones presentan valores del índice de polidispersión entre 0,32 y 0,57 considerados como adecuados para estos estudios y de hecho inferiores a los obtenidos por otros autores en el estudio de formulaciones de anfotericina B poliagregada con tamaños de más de 1000 nm (Larabi, M. y col., 2004) .

La formulación control Fungizona[®] presenta diámetros medios bajos (56,2±4,3 nm), relacionados con el estado dimérico de agregación, mientras

que la formulación de anfotericina B sin desoxicolato sódico (1:0) presenta tamaños de partícula superiores a 1000 nm, valores que podemos relacionar con la forma poliagregada, y además, presenta un población con un tamaño superior a 5000 nm en un porcentaje relativamente elevado (12,1%) tamaños que concuerdan con los obtenidos por otros autores tanto para anfotericina B dimérica como poliagregada (Espada, R. y col., 2008a; Larabi, M. y col., 2004).

La incorporación del desoxicolato de sodio en las formulaciones de anfotericina B induce la formación de estructuras poliagregadas, como se observó en los estudios de espectroscopía UV-VIS, que además, como se puede observar en este estudio de tamaño de partícula, presentan dos poblaciones de poliagregados de diferente tamaño. Con respecto a estas poblaciones de diferente tamaño, es de destacar que la formulación AMB:DCH 1:0,8 es la única que no presenta ninguna población de poliagregados de tamaños superiores a 1000 nm. Sin embargo, esta formulación es la que presenta una población mayoritaria de mayor tamaño (734,0 nm \pm 157,3 nm). Al aumentar la proporción de desoxicolato de sodio en la formulación (AMB:DCH 1:1,5) se observa que los poliagregados de anfotericina B determinados por la técnica espectrofotométrica presentan en este caso una población mayoritaria con un tamaño inferior (444,8 nm \pm 61,1 nm) a la formulación AMB:DCH 1:0,8. Es importante señalar que, aunque esta formulación presenta una segunda población de poliagregados de tamaño próximo a 5000 nm, el porcentaje de esta población es muy pequeño (3,1%) y que además presenta el menor índice de polidispersabilidad (0,32). El progresivo incremento del desoxicolato de sodio en el resto de las formulaciones (AMB:DCH 1:2; AMB:DCH 1:4 y AMB:DCH 1:8) no conlleva una disminución en el tamaño de los poliagregados de población mayoritaria pero si produce un aumento importante de la población de poliagregados de elevado tamaño con porcentajes crecientes entre el 8,3 y el 13,0% a medida que se incrementan las proporciones de desoxicolato de sodio en las formulaciones.

La existencia de poliagregados de gran tamaño deben ser controlados en este tipo de formulaciones como muestran los trabajos realizados por Espada,

R. y col., 2008a, Espuelas, M.S. y col., 2003, Larabi, M. y col., 2004 y Tiyaboondai, W. y Limpeanchob, N., 2007. Las formulaciones con diferentes tamaños de partículas de anfotericina B dentro del estado poliagregado podrían mostrar distintas relaciones de eficacia y toxicidad de forma similar a las que aparecen entre los estados monoméricos, diméricos y poliagregados.

La incorporación de desoxicolato sódico en la formulación en proporciones iguales o superiores a 1,5 es decir, formulaciones donde la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio es 1:1,5; 1:2; 1:4 y 1:8, da lugar a estados poliagregados que se caracterizan por presentar tamaños de partícula menores (rango de 333,8 – 447,2 nm) lo que podría estar relacionado con su distribución en diferentes órganos.

3.4.- Concentraciones de anfotericina B en órganos a las 24 h.

Las concentraciones de anfotericina B analizadas en los diferentes órganos están relacionadas con las características farmacotécnicas y las dosis administradas, mostrándose en la siguiente figura.

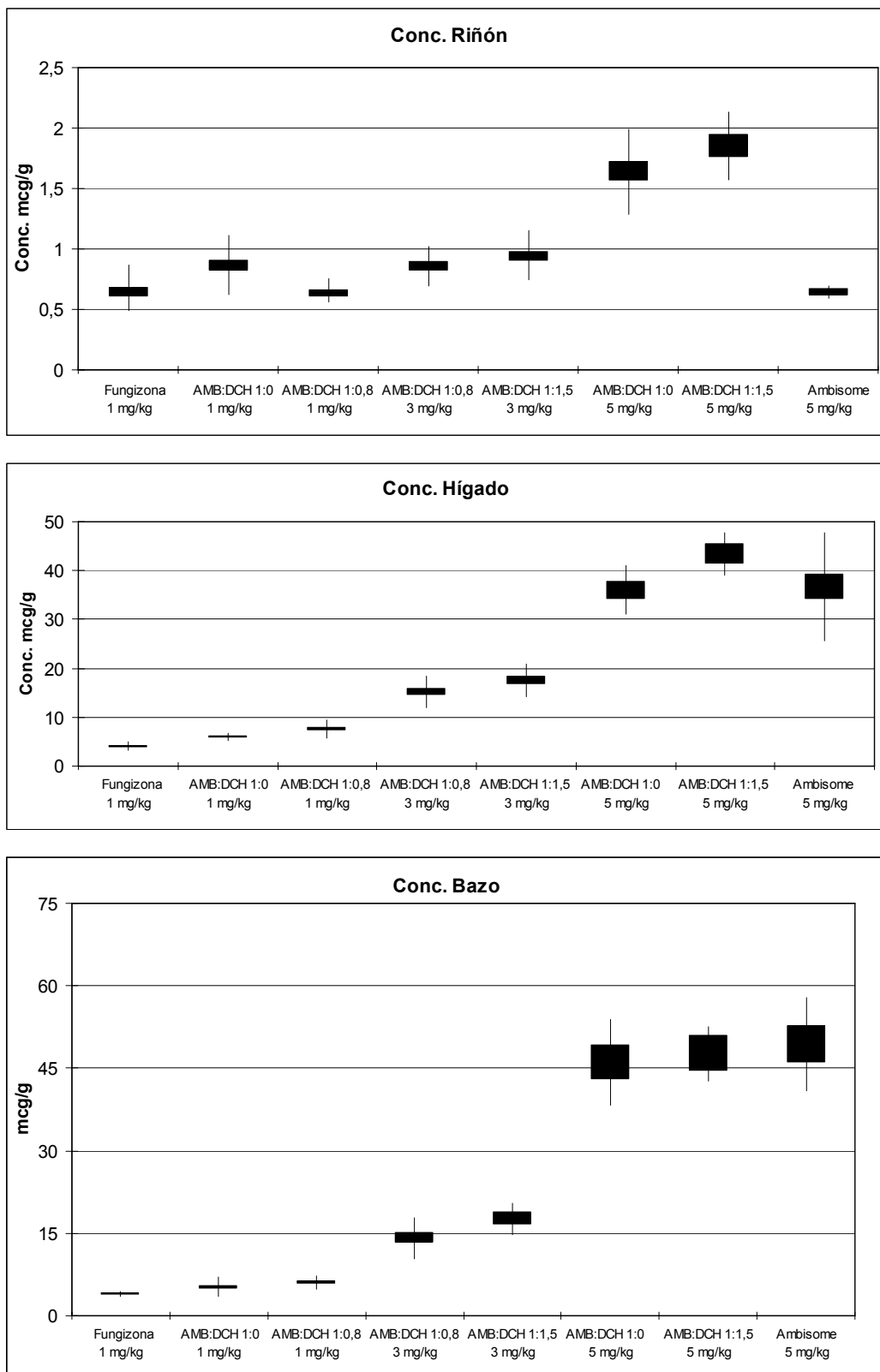


Figura 11. Concentraciones a las 24 h en riñón, hígado y bazo para las distintas formulaciones y dosis.

Las distintas concentraciones a las 24 h a nivel renal están relacionadas con las dosis de anfotericina B administrada y con las características farmacotécnicas de las formulaciones empleadas. Así, tras la administración de AmBisome[®], en el que la anfotericina B se formula en forma poliagregada dentro de una matriz lipídica, se observan bajas concentraciones renales, alcanzando valores de $0,65 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$, después de administrar dosis altas de 5 mg/kg. Sin embargo, la Fungizona[®], en la que la anfotericina B se encuentra en forma dimérica, presenta valores similares a nivel renal ($0,642 \pm 0,037 \mu\text{g/g}$) a pesar de que, en este caso, las dosis administradas son cinco veces menores. Es importante destacar, que las concentraciones renales próximas a $0,6 - 0,9 \mu\text{g/g}$, de acuerdo con el trabajo de Cohen B.E., 1998, estarían relacionadas con la concentración crítica de anfotericina B sobre la membrana celular que produce la aparición de poros acuosos transmembrana, responsables de la alta toxicidad renal de estas formulaciones. En nuestro trabajo se confirma que las formulaciones estudiadas de distintas proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio a dosis de 1 y 3 mg/kg, presentan concentraciones similares a las que se obtienen con Fungizona[®] o AmBisome[®] a las 24 h. Sin embargo, la utilización de dosis de 5 mg/kg, produce altas concentraciones a nivel renal que indican su acumulación renal.

La utilización de formulaciones lipídicas como es el caso del AmBisome[®], en dosis altas de 5 mg/kg, tiene la ventaja de disminuir las concentraciones renales, manteniendo una mayor afinidad por determinados órganos como el hígado y el bazo donde se acumulan mayores concentraciones de anfotericina B como indican Fukui H. y col., 2003. Estas formulaciones, sin embargo, no son la solución frente a infecciones severas debido, posiblemente, a que por sus excipientes de carácter lipídico, la anfotericina B presenta concentraciones muy bajas en órganos como el cerebro y riñón. Esto hace que, en tratamientos frente a *Aspergillus fumigatus* con Abelcet[®] sea el cerebro el órgano que presente un menor descenso en las unidades formadoras de colonias como indican Fukui H. y col., 2003, y Wasan E. K. y col., 2009.

En este sentido, el empleo de anfotericina B en forma poliagregada, administrada con distintas proporciones de un tensoactivo aniónico apto para administración intravenosa, puede ser importante para modificar las concentraciones alcanzadas a nivel renal según las distintas dosis administradas. Así, la administración de dosis de 1 mg/kg de anfotericina B poliagregada (1:0) alcanza concentraciones renales de $0,864 \pm 0,244 \mu\text{g/g}$.

La incorporación de desoxicolato de sodio en bajas proporciones a las formulaciones de anfotericina B poliagregada (1:0,8) producen un ligero descenso en las concentraciones renales alcanzando concentraciones de $0,630 \pm 0,051 \mu\text{g/g}$ y $0,859 \pm 0,065 \mu\text{g/g}$ tras la administración a los ratones de dosis de 1 y 3 mg/Kg respectivamente. Por lo que es necesario el empleo de dosis de 3 mg/Kg de la formulación AMB:DCH 1:0,8 para alcanzar concentraciones renales de AMB superiores a las obtenidas con la Fungizona[®] aunque inferiores a la concentración crítica de anfotericina B sobre la membrana celular que produce la aparición de poros acuosos transmembrana. Así mismo, la administración de formulaciones con dosis más altas de desoxicolato sódico (1:1,5) produce concentraciones renales similares a las 24h, con valores de $0,869 \pm 0,031 \mu\text{g/g}$ tras la administración de dosis de 3 mg/Kg.

Cuando se realizan administraciones de altas dosis a los animales (5 mg/kg) se alcanza valores máximos de concentración renal de $1,642 \pm 0,352 \mu\text{g/g}$ (AMB:DCH 1:0). La utilización de las dosis elevadas de desoxicolato de sodio (AMB:DCH 1:1,5) en la formulación aumenta ligeramente las concentraciones en las células renales, alcanzando en este caso valores de $1,852 \pm 0,279 \mu\text{g/g}$ tras la administración de dosis elevadas (5 mg/kg). Esta alta concentración indica que nuestras formulaciones pueden presentar una acumulación renal a dosis elevadas.

En órganos del sistema retículo endotelial como el hígado y el bazo observamos un comportamiento diferente en función de las formulaciones administradas. Así, formulaciones lipídicas como el AmBisome[®] presentan altas

concentraciones ($36,617 \pm 11,047 \mu\text{g/g}$ en hígado y $49,362 \pm 22,431 \mu\text{g/g}$ en bazo) mientras que las formulaciones de Fungizona[®], en dosis de 1 mg/kg, presentan concentraciones muy bajas en ambos órganos ($4,051 \pm 0,924 \mu\text{g/g}$ en hígado y $3,917 \pm 0,400 \mu\text{g/g}$ en bazo). Estos resultados confirman la mayor afinidad de estas formas poliagregadas lipídicas por hígado y bazo (Fukui H. y col., 2003).

La incorporación de desoxicolato sódico a las formulaciones produce un ligero aumento de la concentración en estos órganos. Así, la administración de una dosis de 1 mg/kg de anfotericina B poliagregada (AMB: DCH 1:0) presenta valores similares a los de la Fungizona[®] ($5,945 \pm 0,754 \mu\text{g/g}$ en hígado y $5,218 \pm 1,711 \mu\text{g/g}$ en bazo). Al incorporar el desoxicolato de sodio a la formulación se produce un pequeño incremento de las concentraciones en hígado y bazo. Así, en formulaciones de AMB: DCH (1:0,8) para las mismas dosis administradas (1 mg/kg) se alcanzan concentraciones de $7,606 \pm 1,785 \mu\text{g/g}$ en hígado y de $6,060 \pm 1,255 \mu\text{g/g}$ en bazo, mientras que cuando se administran dosis de 3 mg/kg, sus concentraciones aumentan con valores de $15,187 \pm 3,185 \mu\text{g/g}$ en hígado y de $14,172 \pm 3,751 \mu\text{g/g}$ en bazo. Al aumentar la proporción del tensioactivo en la formulación AMB:DCH 1:1,5 se consiguen ligeros incrementos de las concentraciones de sustancia activa en dichos órganos, obteniéndose valores de $17,534 \pm 3,342 \mu\text{g/g}$ en hígado y de $17,658 \pm 2,906 \mu\text{g/g}$ en bazo después de la administración de dosis de 3 mg/kg. Estas concentraciones mayores en hígado y bazo también han sido encontradas al emplear distintas formulaciones lipídicas como indican Fukui H. y col., 2003. Esta mayor afinidad por estos órganos hace que estas formulaciones presenten una mayor semivida y una menor afinidad por tejidos como el riñón y el cerebro (Fukui H. y col., 2003 y Wasan E.K. y col., 2009).

La utilización de dosis elevadas de 5 mg/kg en la formulación que contiene únicamente anfotericina B poliagregada (AMB:DCH 1:0) alcanza elevadas concentraciones de anfotericina B en hígado ($35,982 \pm 4,949 \mu\text{g/g}$) y en bazo ($46,029 \pm 7,801 \mu\text{g/g}$). La incorporación de proporciones elevadas de desoxicolato sódico (AMB:DCH 1:1,5) a la formulación no produce cambios

significativos ($p < 0,05$) en las concentraciones en estos órganos. Así, dosis de 5 mg/kg de AMB:DCH (1:1,5) presenta concentraciones de $43,468 \pm 4,333 \mu\text{g/g}$ en hígado y de $49,362 \pm 8,431 \mu\text{g/g}$ en bazo. Estas concentraciones son muy superiores a las que esperábamos encontrar al incrementar cinco veces la dosis de 1 mg/kg. Es posible que estas dosis tan elevadas sean debidas a la existencia de un mecanismo de acumulación en estos órganos y que ha sido previamente observado tras la administración de dosis similares de formulaciones lipídicas como el AmBisome[®] (Espada R. y col., 2008).

La incorporación de agentes micelares como el desoxicolato de sodio a la formulación no disminuye las concentraciones en estos órganos. Sin embargo, la administración de dosis intermedias de anfotericina B (3 mg/kg) con distintas proporciones de agentes aniónicos como el desoxicolato sódico (AMB:DCH 1:0,8 y 1:1,5) produce valores de concentraciones en hígado y bazo tres veces superiores a la administración de 1 mg/kg. Estos estudios muestran un incremento en las concentraciones de anfotericina B es en hígado y bazo dosis dependiente para dosis entre 1 y 3 mg/kg, mientras que dosis de 5 mg/kg produce una destacable acumulación del fármaco en estos órganos.

4.- DISCUSIÓN.

En los estudios de microscopía electrónica se observa que la anfotericina B presenta una morfología característica con partículas esféricas de pequeño tamaño que tiende a aglomerarse, mientras que el desoxicolato sódico presenta partículas lisas de mayor tamaño propias de una estructura poliédrica.

Los espectros *UV-VIS* permiten conocer el estado de agregación mayoritario que presenta cada formulación. Así, se comprueba la existencia de una forma monomérica al emplear como medio de disolución metanol / dimetilsulfóxido, una forma dimérica tras la reconstitución de la formulación comercial Fungizona[®] y una mezcla de estados de agregación en la formulación reconstituida a partir de la especialidad AmBisome[®]. Estos resultados concuerdan con los recogidos en la bibliografía, y su estudio es relevante ya que existe una relación entre los estados de agregación y los valores de toxicidad y eficacia. Autores como Ranchère, J.Y. y col., 1996 y Espuelas M.S. y col., 2003 indican que las formas poliagregadas son mucho menos tóxicas, y permiten el empleo de dosis mayores para el tratamiento de candidiasis.

Los estudios espectrofotométricos de las nuevas formulaciones de anfotericina B con distintas proporciones de desoxicolato de sodio indican que la anfotericina B se encuentra en un estado mayoritariamente poliagregado, con un espectro similar al que presenta la formulación AmBisome[®]. En el estudio del tamaño medio de partícula mediante difracción de luz láser se observó que las distintas formulaciones de anfotericina B presentaron dos poblaciones de diferente tamaño, ambas de tamaño correspondiente a formas poliagregadas de anfotericina B. Al comparar las formulaciones de AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 se observa que al aumentar la proporción de desoxicolato de sodio disminuye el tamaño de partícula de la población mayoritaria pasando de un tamaño de $734,0 \pm 157,3$ nm a $444,8 \pm 61,1$ nm. Estos valores suponen una mejora importante frente a la formulación que no

tiene desoxicolato de sodio y que presentó un tamaño medio de partícula de $1280,0 \pm 216,0$ nm en su población mayoritaria.

Así mismo, las formulaciones que tienen proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio 1:2; 1:4 y 1:8 presentan poblaciones mayoritarias con tamaños medios de partícula de 457,2 nm a 333,8 nm. Sin embargo, estas formulaciones con elevadas proporciones de desoxicolato de sodio presentaron una población minoritaria (con porcentajes entre el 8,3 y el 13,0 %) de tamaño de partícula superior a los 5000 nm algo especialmente importante ya que estas formulaciones son para administración intravenosa. Aunque otros autores muestran tamaños de partícula de sus poblaciones mayoritarias superiores a los 1000 nm (Larabi, M. y col., 2004 y Espada, R. y col., 2008a) para posteriores estudios de eficacia y toxicidad *in vivo* se seleccionan las formulaciones que tengan proporciones de AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 que son las que presentaron menores poblaciones de partículas de gran tamaño.

Las concentraciones de anfotericina B en los distintos órganos están relacionadas con las dosis y con las características farmacotécnicas de las formulaciones empleadas.

En el estudio de las concentraciones de anfotericina B a las 24 h post-administración a nivel renal se observa que las formulaciones con distintas proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio a dosis de 1 y 3 mg/kg, presentan concentraciones similares a las que se obtienen con Fungizona[®] o AmBisome[®] a las 24 h y son inferiores en todos los casos a 1 $\mu\text{g/g}$ de órgano. Sin embargo, la utilización de dosis de 5 mg/kg, produce altas concentraciones a nivel renal que indican su acumulación en este órgano. Estos resultados muestran que las formulaciones de poliagregados de AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 permiten administrar dosis 3 veces mayores que la formulación de Fungizona[®] sin que se observen concentraciones superiores a la concentración crítica de anfotericina B sobre la membrana celular que produce la aparición de poros acuosos transmembrana, responsables de la alta

toxicidad renal de estas formulaciones (Cohen B. E., 1998). La administración de estas formulaciones en concentraciones iguales o superiores a 5 mg/kg requerirían realizar estudios de toxicidad renal ya que inducen la aparición de altas concentraciones de anfotericina B a este nivel.

En los estudios de las concentraciones de anfotericina B a las 24 h post-administración en hígado y bazo demuestran que las nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B y desoxicolato de sodio muestran comportamientos similares a los de la Fungizona[®] en los órganos del sistema retículo endotelial. Las concentraciones de anfotericina B en hígado y bazo aumentan con estas formulaciones al incrementarse la dosis administrada. Así mismo estas formulaciones de poliagregados consiguen concentraciones similares a las obtenidas con el Ambisome[®] cuando se administran dosis de 5 mg/kg.

Por lo tanto las nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B y desoxicolato de sodio alcanzan concentraciones similares al Ambisome[®] en hígado y bazo y así mismo una mayor afinidad por órganos como el riñón. La afinidad por este órgano podría indicar que quizá también alcancen buenas concentraciones en cerebro lo que deberá ser tenido en cuenta en estudios posteriores de eficacia para posibles tratamientos de candidiasis cerebrales (Fukui H. y col., 2003 y Wasan E. K. y col., 2009).

5.- BIBLIOGRAFÍA

- Adams M y Kwon GS. 2004. "Spectroscopic investigation of the aggregation state of amphotericin B during loading, freeze-drying, and reconstitution of polymeric micelles". *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7:1-6.
- Chen W, Gu B, Wang H, Pan J, Lu W y Hou H. 2008. "Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles". *International Journal of Pharmaceutics* 362:133-140.
- Choi K-C, Bang J-Y, Kim P-I, Kim C y Song C-E 2008. "Amphotericin B-incorporated polymeric micelles composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/dextran graft copolymer". *International Journal of Pharmaceutics* 355:224-230.
- Cohen BE. 1998. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *International Journal of Pharmaceutics* 162, 95-106.
- Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP y Torrado JJ. 2008a. "Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations". *International Journal of Pharmaceutics* 361:64-69.
- Espada R, Josa JM, Valdespina S, Dea MA, Ballesteros MP, Alunda JM y Torrado JJ. 2008b. "HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples". *Biomedical Chromatography* 22: 402-407.
- Espuelas MS, Legrand P, Campanero MA, Appel M, Chéron M, Gamazo C, Barratt G e Irache JM. 2003. "Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:419-427.

- Fukui H, Koike T, Saheki A, Sonoke S, Tomii Y y Seki J. 2003. "Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS[®])". *International Journal of Pharmaceutics* 263:51-60.
- Kaszuba M, McKnight D, Connah MT, McNeil-Watson FK y Nobbmann U. 2008. "Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering". *Journal of Nanoparticles Research* 10:823-829.
- Larabi M, Gulik A, Dedieu J-P, Legrand P, Barratt G y Cheron M. 2004. "New lipid formulation of amphotericin B: spectral and microscopic analysis". *Biochimica et Biophysica Acta* 1664:172-181.
- Lincopan N, Mamizuka EM y Carmona-Ribeiro AM. 2003. "In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:412-418.
- Olson JA, Adler-Moore JP, Jensen GM, Schwartz J, Dignani MC y Proffitt RT. 2008. "Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:259-268.
- Ranchère JY, Latour JF, Fuhmann C, Lagallarde C y Loreuil F. 1996. "Amphotericin B intralipid formulation: stability and particle size". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37:1165-1169.
- Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Torrado S-Santiago y Torrado, JJ. 2004. "Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis". *Journal of Drug Targeting* 12:453-460.

- Tabosa do Egito ES, Fessi H, Appel M, Barratt G, Legrand P, Bolard J y Devissaguet J-Ph. 1996. "A morphological study of an amphotericin B emulsion-based delivery system". *International Journal of Pharmaceutics* 145:17-27.
- Tiyafoonchai W y Limpeanchob N. 2007. "Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles". *International Journal of Pharmaceutics* 329:142-149.
- Vandermeulen G, Rouxhet L, Arien A, Brewster ME y Pr at V. 2006. "Encapsulation of amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block-poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles". *International Journal of Pharmaceutics* 309:234-240.
- Vieira DB y Carmona-Ribeiro AM. 2008. "Cationic nanoparticles for delivery of amphotericin B: preparation, characterization and activity *in vitro*". *Journal of Nanobiotechnology* 6:6. DOI: 10.1186/1477-3155-6-6.
- Wasan EK, Bartlett K, Gershkovich P, Sivak O, Banno B, Wong Z, Gagnon J, Gates B, Leon CG y Wasan KM. 2009. "Development and characterization of oral lipid-based Amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*". *International Journal of Pharmaceutics* 372:76-84.

ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ÚNICA.

ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ÚNICA.

1. INTRODUCCIÓN.

En este capítulo se incluyen varios estudios de eficacia y toxicidad para el tratamiento de candidiasis sistémicas.

El efecto post-antifúngico (PAFE) es comúnmente definido como el tiempo necesario para que un cultivo recupere su crecimiento después de un tiempo de exposición a un agente antifúngico. Estos estudios de efecto post-antifúngico son especialmente importantes en el caso de la anfotericina B ya que otros antifúngicos tan utilizados como el itraconazol o más modernos como ravuconazol, voriconazol o posaconazol presentan bajos niveles de efecto post-antifúngico (Manavathu E.K. y col., 2004, y Chryssanthou, E. y col., 2008).

Resulta también importante recordar que el efecto post-antifúngico depende de diferentes variables como el número de colonias, el agente antifúngico, los medios de crecimiento utilizados y el tiempo de exposición utilizado en cada estudio (Vitale, R.G. y col., 2003). Chryssanthou, E. y col., 2008, muestran que antifúngicos como el voriconazol presentan un efecto fungicida tras 24 h de exposición mientras que, tras tiempos de exposición de únicamente cuatro horas, no se observa este efecto.

Autores como Chryssanthou, E. y col., 2008, indican que la anfotericina B presenta un PAFE elevado concentración y tiempo dependiente. Este trabajo muestra que concentraciones de anfotericina B superiores a 1,25 mg/l permiten obtener altos valores de PAFEs que se incrementan al aumentar los tiempos de exposición. Por otra parte, Ernst, E.J. y col., 2000, obtienen para la anfotericina B tiempos post-antifúngicos superiores a las 12 h cuando las concentraciones son entre 0,25 y 4 veces la concentración mínima inhibitoria (MIC) mientras que concentraciones de 0,125 x MIC no presentan prácticamente este efecto post-antifúngico. Es habitual la realización de estudios con valores de anfotericina

entre 1-10 x MIC tanto en tratamientos de *C. albicans* como de *A. fumigatus* (Manavathu, E.K. y col., 2004, y Chyssanthou, E. y col., 2008). Así, para *Candida albicans*, Manavathu E.K. y col., 2004, obtuvieron valores de PAFE de $5,3 \pm 1,15$ h tras la administración de concentraciones de anfotericina B de 8 x MIC.

Otros trabajos microbiológicos, realizan estudios de curvas de letalidad (Szabó, Z. y col., 2009). El valor de este parámetro permite determinar la actividad fungicida de la sustancia activa objeto de estudio así como la actividad fungistática permitiendo comparar las actividades *in vitro*. La actividad fungicida se obtiene al alcanzar una reducción del 99,9% en el recuento de las células viables, expresadas en unidades formadoras de colonias por mililitro (cfu/ml), respecto al inóculo inicial mientras que la actividad fungistática se obtiene al alcanzar una disminución del número de colonias viables inferior al 99,9%.

La anfotericina B, dependiendo de las concentraciones administradas, pueden presentar una actividad fungicida o fungistática. Autores como Klepser, M.E. y col., 1997, indican que la anfotericina B tiene un efecto fungistático frente a *Candida albicans* en concentraciones inferiores a 0,5 x MIC mientras que presenta una actividad fungicida a concentraciones de anfotericina B $\geq 0,5$ x MIC. Keele, D.J. y col., 2001, determinan que esta actividad fungicida se produce a concentraciones elevadas de anfotericina B, superiores a 2,4 $\mu\text{g/ml}$.

La determinación de las curvas de letalidad permite relacionar la actividad fungicida de un agente antifúngico con los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) que presente la sustancia activa frente al patógeno como indican Szabó, Z. y col., 2009, para distintas especies de *Candida*. La actividad fungicida, determinada a través de las curvas de letalidad, se obtiene a las 24-48 h en un rango de concentraciones de 1-4 x MIC para *C. parapsilosis*, y para *C. metapsilosis*. En el caso de *C. orthopsilosis* la actividad antifúngica de la anfotericina B se alcanza a las 24 h tras la administración de 1-4 x MIC aunque, en determinadas cepas resistentes, se necesitan niveles de 8-16 x MIC.

Si bien es cierto que la actividad antifúngica de la anfotericina B puede depender de la sensibilidad o resistencia de *Candida* spp, la acción fungicida está también condicionada por la posible inestabilidad de la anfotericina B. Groeschke, J. y col., 2006, determinan el porcentaje de anfotericina B, formulada en una concentración de 7,4 mg/ml, que se mantiene en las suspensiones durante quince días tras someterlas a distintas condiciones ambientales como son variaciones en la temperatura, la exposición a la luz o el tipo de envase mostrándose los resultados obtenidos en las siguientes tablas.

ENVASE EMPLEADO	TEMPERATURA (°C)	% INICIAL DE ANFOTERICINA B	% FINAL DE ANFOTERICINA B
POLIPROPILENO	19-23	100,0±2,7	82,1±2,5
CRISTAL BORICADO	19-23	100,0±3,1	77,6±2,9

Tabla 1.- Efecto del envase en la estabilidad de la anfotericina B, inicial y después de 15 días de almacenamiento.

TIPO DE LUZ	TEMPERATURA (°C)	% INICIAL DE ANFOTERICINA B	% FINAL DE ANFOTERICINA B
PROTEGIDA DE LA LUZ	19-23	100,0±1,2	83,1±3,0
LUZ SOLAR (13 h)	25-28	100,0±4,5	80,2±5,4
LUZ ELÉCTRICA	19-23	100,0±2,7	82,1±2,5

Tabla 2.- Efecto de la luz en la estabilidad de la anfotericina B conservada durante 15 días en un envase de polipropileno.

ENVASE EMPLEADO	TEMPERATURA (°C)	% INICIAL DE ANFOTERICINA B	% FINAL DE ANFOTERICINA B
POLIPROPILENO	4	100,0±4,3	96,4±2,5
POLIPROPILENO	19-23	100,0±1,2	83,1±3,0
POLIPROPILENO	37	100,0±0,8	88,1±3,0

Tabla 3.- Efecto de la temperatura en la estabilidad de la anfotericina B, almacenada durante 15 días protegida de la luz.

La anfotericina B se mantiene estable al conservarla a bajas temperaturas (4°C) y protegida de la luz y preferentemente en envases de polipropileno. Todas las muestras presentan un descenso biexponencial de la concentración de anfotericina B en el tiempo con semi-vidas de 1,6-2,9 días, debido a su degradación química y también posiblemente a una posible adsorción de la sustancia activa al envase. Estos estudios son importantes ya que confirman la baja estabilidad de la anfotericina B pudiendo disminuir la potencia de este antifúngico en cultivos para periodos, superiores a las 24 – 48 horas.

Además de los efectos fungicidas o fungistáticos que pueden presentar los agentes antifúngicos, es importante conocer el hecho de que la administración de varias sustancias activas de manera simultánea puede inducir efectos sinérgicos, antagónicos o no presentar interacciones entre ellas como indican Traboulsi, R. S. y col., 2008, en función del índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI). Este parámetro es el resultado del cociente de la suma de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) utilizadas conjuntamente dividido entre el MIC de la sustancia activa empleada sola (An, M. y col., 2009).

La obtención de valores de FICI a partir de la administración conjunta de las sustancias activas permitirá definir el tipo de interacción que presenten. De este modo, y como indica Sionov, E. y col., 2006, valores de $FICI \leq 0,5$ implican la existencia de sinergismo entre ellas y valores de $0,5 > FICI \geq 1$ muestran un efecto aditivo. Sin embargo, datos de FICI entre 1 y 4 implican la ausencia de interacción mientras que cuando sean superiores a 4 existiría antagonismo. Esta clasificación es similar a la indicada por Natesan, S.K. y col., 2008, y An, M. y col., 2009. No obstante, estos últimos autores clasifican los efectos en tres grandes grupos, sinergismo, con valores de FICI menores a 0,5, sin interacción donde $0,5 < FICI \leq 4$, y en antagonismo, de los valores de FICI son superiores a 4. En el presente trabajo de investigación de formulaciones de poliagregados de anfotericina B y desoxicolato de sodio la determinación del valor de FICI será útil para evaluar un posible efecto sinérgico del desoxicolato sódico en la formulación.

Por otra parte, uno de los efectos adversos de la anfotericina B consiste en su actividad hemolítica. Sin embargo, es importante destacar que la reducción en la toxicidad hemolítica de las formulaciones de anfotericina B se asocia a una disminución en su actividad como indican Espuelas, M.S. y col., 2003.

Múltiples factores parecen estar implicados en la modificación de la relación de eficacia y toxicidad de distintas formulaciones de anfotericina B. Entre ellos, uno de los más importantes que afectan a la toxicidad del principio activo es el estado de agregación. Espada, R. y col., 2008a, indican que la menor toxicidad de la anfotericina B corresponde al estado poliagregado como el que presenta la formulación comercial AmBisome[®]. Así mismo, la toxicidad de formulaciones de anfotericina B poliagregada y Fungizona[®] tras someterla a calentamiento, parece estar relacionada con su tamaño de partícula de manera que, cuanto menor sea el tamaño de partícula, mayor será la toxicidad determinada por hemólisis, pudiéndose concluir que el estado de agregación y el tamaño de partícula afectan seriamente a la toxicidad de la anfotericina B.

Por lo tanto, en base a estos datos, lo ideal sería el desarrollo de una formulación poliagregada pero con pequeño tamaño de partícula. Esto permitiría incrementar su penetración en los tejidos desde donde podría cederse sin producir acumulaciones en ellos, permitiendo, a la vez, el tratamiento de infecciones diseminadas.

En cualquier caso, además de la determinación de actividad frente a los agentes patógenos y la realización de estudios *in vitro* para determinar la toxicidad, las formulaciones con acción antibiótica, ya sea a nivel microbiano, fúngico o vírico requieren de la elaboración de estudios de eficacia y toxicidad *in vivo* con el fin de determinar su utilidad frente a las infecciones para las que se han elaborado.

En este sentido, se pueden encontrar autores como Tabosa Do Egito, E.S. y col., 1996, que realizan el estudio de la eficacia de una emulsión que contiene

0,5 mg/mL de anfotericina B comparada con una formulación comercializada de Fungizona® (5 mg/mL). Ambas formulaciones se administran en dosis de 0,8 mg/kg, en tratamiento de candidiasis sistémica experimental en ratones Balb/C. Los resultados se evalúan a los 5 y 9 días post-tratamiento.

García, A. y col., 2000, determinan los valores de unidades formadoras de colonias (cfu) a los siete días tras la administración de un tratamiento profiláctico en ratones posteriormente infectados con *Candida albicans*. Este estudio compara la eficacia en riñón y en bazo de un tratamiento con Ambisome® a dosis de 1,5, 10 y 20 mg/kg frente a Fungizona® en dosis de 1 mg/kg. El tratamiento con Ambisome® mostró un efecto profiláctico en todas las dosis en ratones inmunocompetentes. No obstante, en el caso de ratones inmunosuprimidos, únicamente al administrar dosis de 20 mg/kg de Ambisome® se obtienen resultados significativamente superiores a los observados con Fungizona®.

Takemoto, K. y col., 2006, indican que el riñón es el órgano más infectado en las candidiasis. Sus estudios determinan los niveles de unidades formadoras de colonias de *C. albicans* a nivel sanguíneo y a nivel renal en ratones. Las dosis administradas fueron de 0,3; 1; 3 y 10 mg/kg de Ambisome® o dosis de 0,03; 0,1; 0,3 y 1 mg/kg de Fungizona®. La disminución de las unidades formadoras de colonias, al día siguiente de la administración, resulta similar tras la administración de 10 mg/kg de Ambisome® y 1 mg/kg de Fungizona®. Sin embargo, se observa un incremento de los microorganismos a nivel renal entre el día 1 y el 7 tras la administración de Fungizona®. Transcurridos 30 días de la administración de dosis de 10 mg/kg de Ambisome®, los riñones no presentan niveles detectables de *Candida albicans*.

Por otra parte, autores como Espada, R. y col., 2008c, realizan la determinación de la candidiasis sistémica en riñones y cerebro. Para ello, se realiza la administración de una dosis de 1 mg/kg anfotericina B y desoxicolato de sodio, de anfotericina B en forma de micropartículas de 1; 5 y 10 mg/kg y anfotericina B poliagregada de 10 mg/kg a los siete días de la infección por

Candida albicans en ratones ICR. Los resultados obtenidos en la colonización en riñones y de cerebro no presentan diferencias significativas entre la anfotericina B formulada junto con desoxicolato de sodio, con estructura dimérica, en dosis de 1 mg/kg y las dosis de 10 mg/kg de anfotericina B en forma tanto de micropartículas como poliagregada. En los tres casos, se obtiene una colonización a nivel renal de 4,5 log cfu y a niveles de 1,5 log cfu a nivel cerebral.

Como se ha comentado anteriormente, la especie *Candida albicans* tiene una especial afinidad por los riñones pudiendo alterar tanto su morfología como su funcionalidad. Esta nefrotoxicidad de los ratones infectados se puede ver agravada ya que la anfotericina B es también muy tóxica a nivel renal y, por otra parte, presenta toxicidad a otros niveles como por ejemplo los glóbulos rojos (Charvalos, E. y col., 2006).

En cuanto a esta toxicidad, los parámetros estudiados de nefrotoxicidad suelen incluir la creatinina sérica. De este modo, Kwong, E.H. y col., 2001, muestran un incremento del 50% en los valores de creatinina sérica, obtenidos mediante reacciones enzimáticas, después de la administración de una dosis única de 1 mg/kg de Fungizona[®] ($91 \pm 4 \mu\text{mol/L}$) mientras que la administración de poliagregados obtenidos por calor presenta únicamente ligeros incrementos en los niveles de creatinina sérica ($65 \pm 5 \mu\text{mol/L}$), considerándose la existencia de daño renal cuando los valores de creatinina en suero duplican a los valores de referencia o control.

En base a los diversos trabajos analizados, en este capítulo se desarrollan para las distintas formulaciones estudios microbiológicos con el fin de determinar los principales parámetros como son la concentración mínima inhibitoria y el efecto post-antifúngico. Con respecto la toxicidad se evalúa la acción hemolítica y las posibles alteraciones de la funcionalidad renal originadas por la infección o por los tratamientos. Finalmente, se analizará la eficacia de los tratamientos mediante la evaluación de la supervivencia y la colonización cerebral y renal por *C. albicans*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- *Materiales.*

2.1.1.- Productos y reactivos.

Tanto la anfotericina B (AMB) como la especialidad farmacéutica Fungizona[®] (formulación comercializada de anfotericina B con desoxicolato de sodio) fueron suministradas por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España).

El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemie A.G. (Buchs, Suiza).

La especialidad farmacéutica Ambisome[®] (formulación comercializada de liposomas compuestos de anfotericina: fosfatidilcolina: colesterol: distearoilfosfatidilglicerol 50:213:52:84 p/p/p/p) se encuentra comercializada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).

El suero fisiológico Vitulia (cloruro sódico al 0,9%) se encuentra comercializado por Laboratorios Ern, S. A. (Barcelona, España) y el agua purificada estéril fue obtenida por un sistema Milli-Q (Millipore, USA).

2.1.2.- Material biológico.

Inóculo:

La cepa de *Candida albicans* SC5314 fue la empleada en todos los experimentos. Para los estudios de infección, la cepa fue sembrada en placa agar de extracto de levadura y dextrosa (Yeast Extract-Dextrose o YED), lavada dos veces con tampón fosfato salino pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline

o PBS) y diluido con el mismo tampón para obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ cfu/ml.

Suspensión de eritrocitos:

La obtención de la suspensión de eritrocitos se realiza a partir de sangre venosa de voluntarios sanos.

Animales:

El ensayo se lleva a cabo con ratones machos ICR (25-30 g), después de un periodo de aclimatación de 7 días. Los animales son separados en grupos de 7 animales cada uno y mantenidos durante el tiempo de experimentación en jaulas de plástico con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas en el laboratorio de experimentación animal de la Universidad Complutense de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva 86/609/EU de la legislación de la Unión Europea.

2.2.- Métodos.

2.2.1.- Método para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de la anfotericina B para *Candida albicans* SC5314 fue determinada mediante una técnica de microdilución M27-A, según la Guía del National Committee for Clinical Laboratory Standards M-27A (NCCLS, 1997). El rango de concentraciones estudiadas fue 0,10 -1,0 mg/L para la determinación del MIC. Su determinación fue realizada por triplicado con ± 1 dilución seriada del antifúngico. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) obtenidas para *Candida albicans* fueron determinadas

utilizando un inóculo de 10^6 cfu/ml procediéndose a realizar diluciones hasta valores de $1 \cdot 10^3$ cfu/ml.

2.2.2.- Método para la determinación del efecto post-antifúngico (PAFE).

El efecto post-antifúngico de la anfotericina B en *C. albicans* SC5314 fue evaluado y determinado como el tiempo requerido para la multiplicación de las células tras retirar el antifúngico del medio. El método seguido fue descrito por Manavathu, E.K. y col., 2004, para el efecto post-antifúngico. Así, se incubó una suspensión con una concentración de $1 \cdot 10^6$ cfu/ml *C. albicans* a 35°C en un mililitro de medio RPMI 1640 durante una hora en presencia de concentraciones de anfotericina B de 1,4; 2,0 y 4,0 x MIC. Las células tratadas con el antifúngico fueron lavadas y resuspendidas en un medio de crecimiento libre de antifúngico que se incubó a 35°C durante un tiempo máximo de 24 horas.

A distintos intervalos de tiempo (1; 3; 5; 18 y 24 h) después del lavado, alícuotas de 0,1 ml fueron extraídas y diluidas entre 10 y 1000 veces. A continuación, se procedió a sembrar nuevamente alícuotas de 0,1 ml en agar Sabouraud-dextrosa. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 48 horas y se determinaron las cfu/ml.

El PAFE, expresado en horas, fue calculado utilizando la fórmula:

$$PAFE = T - C$$

donde, T y C son el tiempo de un primer incremento significativo para las muestras tratadas con el antifúngico y el control sin fármaco respectivamente y se expresan en horas.

Los experimentos fueron realizados por triplicado. El tiempo para alcanzar el valor de C fue calculado con, al menos, seis controles y se determinó la media con un intervalo de confianza superior al 95%.

2.2.3.- Método para la determinación de FICI.

El índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI) se obtiene a partir de las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias. Resulta del cociente de la suma de las concentraciones mínimas inhibitorias de dos sustancias activas dividida entre la concentración mínima inhibitoria cuando se utiliza una de las sustancias activas de manera individual (Sionov, E. y col., 2006).

2.2.4.- Método para determinar la curva de letalidad.

Las colonias se suspenden en medio 1640 RPMI (Sigma) y fueron incubadas con agitación a 35°C. La concentración de la suspensión de las colonias fue ajustada espectrofotométricamente a 10^3 cfu/ml. Un total de 3 ml de suspensión de colonias fue adicionado a 3 ml de medio Sabouraud-dextrosa sólo (control) o a diluciones de anfotericina B en medio Sabouraud-dextrosa que contengan concentraciones finales de 1,5; 2,0 y 4,0 x MIC. Las soluciones fueron sometidas a 35°C en agitación. A tiempos predeterminados (0; 1; 3; 5; 18 y 24 h), alícuotas de 100 µl de muestra fueron retiradas de la suspensión y sembradas en placas de agar Sabouraud-dextrosa e incubadas a 35°C durante 48 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado con la cepa *Candida albicans* SC5314. Las curvas de letalidad se realizaron mediante la determinación del número medio de colonias (\log_{10} cfu/ml) frente al tiempo (h). El límite de cuantificación utilizado para este método es de 50 cfu/ml.

2.2.5.- Determinación de la actividad hemolítica de las formulaciones de anfotericina B.

La determinación de la hemólisis de las formulaciones objeto de estudio así como de las formulaciones de referencia (Fungizona® y AmBisome®) y de la formulación control (solución tampón fosfato), se realiza por triplicado.

Para ello, la sangre venosa de los voluntarios sanos es extraída y recogida en tubos previamente heparinizados (heparina sódica en una concentración de 50000 UI/ml) para evitar la coagulación de la sangre. A continuación, se procede a la centrifugación de la sangre a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos.

Se retira el sobrenadante tras la centrifugación y se realizan tres lavados consecutivos del sedimento con PBS a pH de 7,4. Para ello, se resuspende el sedimento en 10 ml de PBS, se centrifuga la suspensión de hematíes durante 10 minutos a 1000 rpm en cada lavado y se elimina el sobrenadante. Este proceso de lavado se repetirá dos veces más.

Se estudian las formulaciones liofilizadas de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:1,5; 1:2; 1:4; 1:8; 0:2 y 0:4. Estas formulaciones liofilizadas son tamizadas a través de una luz de malla de 0,297 mm y se suspenden en los volúmenes adecuados de PBS.

La concentración de anfotericina B empleada en cada una de las formulaciones liofilizadas así como en las formulaciones de referencia será de 100 µg/ml. Los ensayos de hemólisis se realizan utilizando 2 ml de suspensión de glóbulos rojos en PBS y 2 ml de cada formulación de anfotericina B.

La determinación de los valores de hemólisis total se obtiene al añadir a los 2 ml de suspensión de eritrocitos 5 ml de agua purificada estéril.

El control de los procesos de hemólisis se realiza añadiendo a los dos mililitros de suspensión de glóbulos rojos dos mililitros de PBS. De este modo, se puede conocer si la hemólisis producida en los ensayos se debe a las formulaciones o al PBS.

Los tubos de ensayo con los eritrocitos y las distintas formulaciones de anfotericina B se mantienen en un baño en agitación con una velocidad de 100 impulsos/ minuto durante una hora a 37°C. Una vez finalizada la incubación, se procede a detener el proceso de hemólisis manteniendo las suspensiones de eritrocitos tratadas a 4° C durante cinco minutos.

Se procede a centrifugar las suspensiones a 4000 rpm durante 10 minutos. La lectura del sobrenadante a 575 nm permite determinar el porcentaje de hemólisis originado por cada formulación.

Los valores de hemólisis, expresados en porcentaje, se obtendrán utilizando la expresión:

$$[(Abs_m - Abs_{PBS}) / (Abs_T - Abs_{PBS})] * 100$$

Donde:

- Abs_m es la absorbancia obtenida con la formulación objeto de estudio.
- Abs_{PBS} es la absorbancia media obtenida con el PBS.
- Abs_T es la absorbancia media obtenida en las muestras donde la lisis es máxima.
- 100 permite expresar la hemólisis en porcentaje.

2.2.6.- Modelo de infección en ratones.

La infección se realiza mediante la administración de 0,5 ml de la suspensión de la cepa SC5314 de *C. albicans* a través de la vena lateral de la cola de los ratones 72 horas antes de administrar el tratamiento.

Las eficacias de los tratamientos se conocerán el día 26, tiempo establecido desde la primera administración de cada uno de los tratamientos mediante el estudio de la supervivencia tanto diaria como al final del ensayo. Además, se estudiarán los tiempos de supervivencia media (Mean Survival Time o MST).

Debido a la mayor afinidad de *C. albicans* por el cerebro y los riñones, se realizarán estudios de colonización de *C. albicans* tanto a nivel cerebral como a nivel renal. De este modo, se conocerán el aclaramiento del patógeno y la eficacia de los tratamientos administrados para su erradicación mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (cfu).

El número de unidades formadoras de colonias se conoce tras la siembra de los homogeneizados de riñones y cerebro de los ratones. Para ello, los ratones son sacrificados mediante inhalación de cloroformo, extrayendo asépticamente tanto los riñones como el cerebro. La homogeneización de los órganos fue llevada a cabo en 5 ml de solución tampón fosfato. Los órganos homogeneizados fueron sembrados en agar levadura-dextrosa-cloranfenicol y sembrados durante 24-48 horas a 37° C.

Sin embargo, a nivel renal, es necesario considerar la posible nefrotoxicidad que puede afectar a su funcionalidad. Por esta razón, se analizaron los valores de creatinina y nitrógeno ureico en plasma. Además, se analiza la posible afectación hepática mediante el estudio de las enzimas hepáticas (AST y ALT).

2.2.7.- Administración del tratamiento.

Este estudio se realiza con ocho grupos de 4 ó 7 ratones cada uno.

Se emplean dos grupos control de 4 ratones que no reciben tratamiento con anfotericina B a los que solo se les administran 0,2 ml de suero salino 0,9%, uno de ellos infectados con *Candida albicans* y otro sin infectar.

Los grupos de ratones tratados con anfotericina B (4 ratones) a partir de las formulaciones de referencia (AmBisome[®] o Fungizona[®]) reciben 0,2 ml de cada una de las formulaciones.

Los grupos de ratones tratados con anfotericina B (7 ratones) a partir de cada una de las formulaciones a estudiar reciben 0,2 ml de cada una de las formulaciones.

En la Tabla 4 se muestran los tratamientos y dosis recibidas de los grupos control y referencia.

En la Tabla 5 se indican los tratamientos y dosis recibidas de las nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B.

TRATAMIENTO	DOSIS
AmBisome [®]	5 mg/kg
Fungizona [®]	1 mg/kg
Control (con infección)	--
Control (sin infección)	--

Tabla 4.- Relación de los grupos control así como de las dosis administradas en el tratamiento de la candidiasis sistémica.

TRATAMIENTO	DOSIS
AMB:DCH 1:0,8	3 mg/kg
AMB:DCH 1:0,8	5 mg/kg
AMB:DCH 1:1,5	3 mg/kg
AMB:DCH 1:1,5	5 mg/kg

Tabla 5.- Relación de las formulaciones objeto de estudio y de las dosis administradas en el tratamientos de la candidiasis sistémica. AMB:DCH corresponde a la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio administrado en cada formulación.

3. RESULTADOS.

3.1.- Estudio de los valores de concentración mínima inhibitoria.

Los resultados del estudio indican que *Candida albicans* SC5314 es sensible al tratamiento con anfotericina B, alcanzando niveles de MIC de 1,0 mg/L, valores similares a los que obtienen Ernst E.J. y col., 2000, para las cepas de *C. albicans* 90028 y OY31,5 al presentar valores de MIC de 0,5-1,0 mg/L para la anfotericina B mientras que autores como Manavathu, E.K. y col., 2004, muestran menores valores de MIC (0,125 mg/L frente a anfotericina B para *C. albicans* 90028). La diferencia de resultados depende de las condiciones en las que se realiza cada estudio.

3.2.- Estudio del efecto post-antifúngico (PAFE).

La determinación del PAFE de anfotericina B ha sido llevada a cabo por varios autores existiendo distintos trabajos para la determinación del PAFE como Manavathu, E.K. y col., 2004; Vitale, R.G. y col., 2003 y Ernst, E.J. y col., 2000.

Los valores de PAFE dependen de varios factores como son número de colonias viables de partida, las concentraciones de anfotericina B utilizada, el tiempo de exposición a la misma y los medios de cultivo empleados. Estas diferencias en los métodos hacen que los distintos artículos consultados presenten diferentes tiempos post-antifúngicos.

Este estudio se realiza con concentraciones de anfotericina B de 1,4 a 4,0*MIC, y muestra en todos los casos retrasos en el crecimiento y en la multiplicación de *C. albicans* excepto en el control sin fármaco que muestra crecimiento de colonias desde el principio del ensayo (1 h). Estos resultados confirman que la anfotericina B tiene un efecto post-antifúngico prolongado,

obteniéndose resultados a partir de 1,4*MIC de anfotericina B. La importancia de este experimento consiste en evaluar si la incorporación de determinadas proporciones de desoxicolato sódico en las formulaciones favorece el efecto post-antifúngico. Estos resultados suponen un avance importante frente a otros agentes fungistáticos como el itraconazol y el posaconazol que carecen de PAFE prolongados frente a *C. albicans* (Manavathu, E. K. y col., 2004).

Los valores medios y las desviaciones estándar obtenidas en el estudio del efecto post-antifúngicos obtenidos se muestran en la Tabla 6.

FORMULACIONES	PAFE ± S. D. (HORAS)		
	1,4*MIC	2*MIC	4*MIC
AMB:DCH 1:0	18,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	22,00 ± 3,46
AMB:DCH 1:0,4	18,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00
AMB:DCH 1:0,8	18,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00
AMB:DCH 1:1,5	18,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00
AMB:DCH 1:2	18,00 ± 0,00	20,00 ± 3,46	24,00 ± 0,00
AMB:DCH 1:3	18,00 ± 0,00	22,00 ± 3,46	> 24,00
AMB:DCH 1:4	18,00 ± 0,00	22,00 ± 3,46	> 24,00

Tabla 6.- Resultados obtenidos en el estudio del efecto post-antifúngico (PAFE) tras la administración de concentraciones 1,4; 2 y 4 veces la concentración mínima inhibitoria (MIC) de anfotericina B formulada en distintas proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio. S. D. equivale a la desviación estándar.

Los resultados del PAFE obtenidos para las distintas formulaciones con desoxicolato de sodio se muestran en las Figuras 1 y 2 y presentan rangos de 18 a > 24 h.

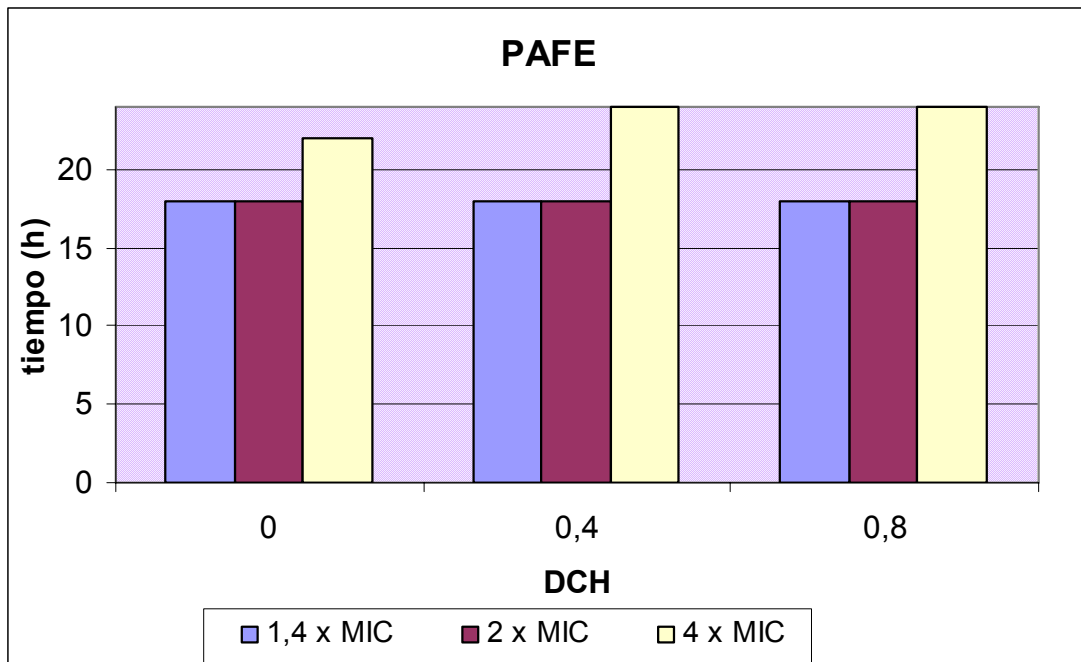


Figura 1.- Valores de PAFE obtenidos con las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:0; 1:0,4 y 1:0,8.

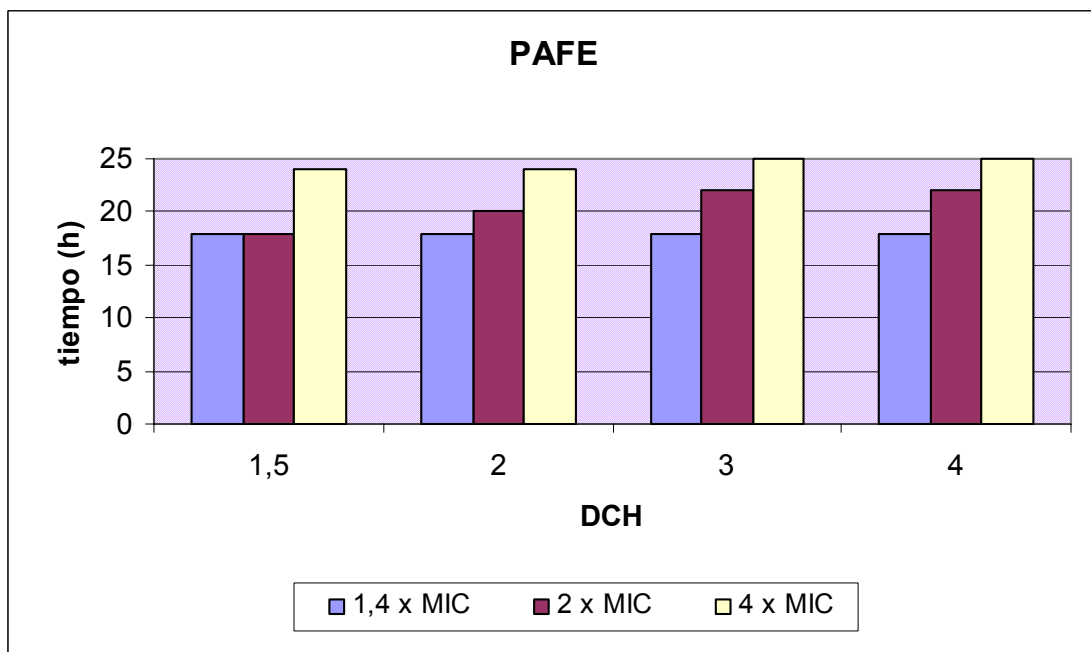


Figura 2.- Valores de PAFE obtenidos con las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:1,5; 1:2; 1:3 y 1:4.

En este estudio se comprueba que cuando se emplean proporciones de desoxicolato sódico inferiores o iguales a 1,5 sólo se observa un incremento en el PAFE si la concentración de anfotericina B es 4*MIC. Concretamente este efecto post-antifúngico se hace máximo (≥ 24 h) en todas las formulaciones que contienen desoxicolato de sodio (en proporciones desde 0,4 a 4) si se ha administrado esta dosis máxima de anfotericina B. Sin embargo, la formulación que no presenta el fármaco poliagregado con el desoxicolato de sodio (AMB:DCH 1:0) no llega a alcanzar este máximo PAFE ni siquiera a esta dosis elevada.

Cuando las proporciones de desoxicolato de sodio en las formulaciones es igual o superior a 2 los efectos post-antifúngicos también aumentan a partir de 2*MIC, es decir se observa un efecto aditivo entre la inclusión del desoxicolato y la dosis administrada de anfotericina B. Es importante destacar que cuando las proporciones de desoxicolato de sodio son elevadas (AMB:DCH 1:3 y AMB:DCH 1:4) no se llega a observar crecimiento de colonias en las 24 horas el estudio cuando se administran dosis 4*MIC.

Todas las formulaciones de poliagregados de anfotericina B y desoxicolato de sodio presentan efectos post-antifúngicos iguales o superiores a las 24 horas, cuando las dosis de anfotericina B administradas son 4*MIC o incluso a 2*MIC cuando las proporciones de desoxicolato de sodio son elevadas (AMB:DCH 1:3 y AMB:DCH 1:4) algo que resulta fundamental ya que podría mejorar la eficacia de tratamientos frente a *C. albicans* cuando los intervalos posológicos se realicen cada 24 h.

3.3.- Estudio de los valores del índice fraccional de concentración inhibitoria.

La incorporación de concentraciones crecientes de desoxicolato de sodio en las formulaciones produce un índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI) de 0,8 cuando la proporción de desoxicolato de sodio es mayor o igual a 0,5 en la formulación. Estos resultados son considerados como aditivos al encontrarse dentro del rango $0,5 < \text{FICI} \leq 1$ según los estudios de Sionov, E. y col., 2006.

Aunque estos valores no pueden ser considerados como una actividad sinérgica con la anfotericina B, nos permite considerar que el desoxicolato de sodio en la formulación tendrá un efecto aditivo sobre la actividad antifúngica que explicaría los descensos observados en la curva de letalidad. Autores como Sionov, E. y col., 2006, han realizado estudios en el que se compara anfotericina B en forma dimérica (Fungizona[®]) frente a una emulsión lipídica de anfotericina B, que contiene un 20% de Intralipid[®], en combinación con caspofungina. En este estudio se observa que estas formulaciones lipídicas de anfotericina B producen un ligero descenso en el FICI. Estos valores varían de 0,63 en el caso de mezclas de anfotericina B y caspofungina a 0,52 para las formulaciones de anfotericina B lipídicas con caspofungina.

3.4.- Estudios de las curvas de letalidad obtenidas tras la administración de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio.

Las curvas de letalidad fueron realizadas a partir de un inóculo inicial (10^5 cfu/ml) incrementándose una unidad logarítmica de media durante las siguientes 24 horas del estudio.

Las figuras 3-5 muestran las curvas de letalidad de la anfotericina B frente a *C. albicans*. En estas figuras, se compara la influencia de proporciones bajas de desoxicolato de sodio en las formulaciones de anfotericina B. Las

proporciones de anfotericina B y desoxicolato empleadas fueron 1:0; 1:0,4; 1:0,8 y 1:1,5. Estos estudios se realizaron a 1,4*MIC, 2*MIC y 4*MIC. En todos los casos, se observa una actividad fungicida al cabo de una hora de estudio. A las cinco horas de estudio las dosis de 2 y 4*MIC presentaron menores valores de unidades formadoras de colonias que cuando se administra 1,4*MIC. Estos resultados coinciden con los observados por diferentes autores como Keele, D.J. y col., 2001, que indican que a altas concentraciones de anfotericina B (2,4 µg/ml) se alcanza rápidamente la actividad fungicida establecido con tiempos cortos (1,5-5 h), tiempos similares a los que se obtienen con las nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B.

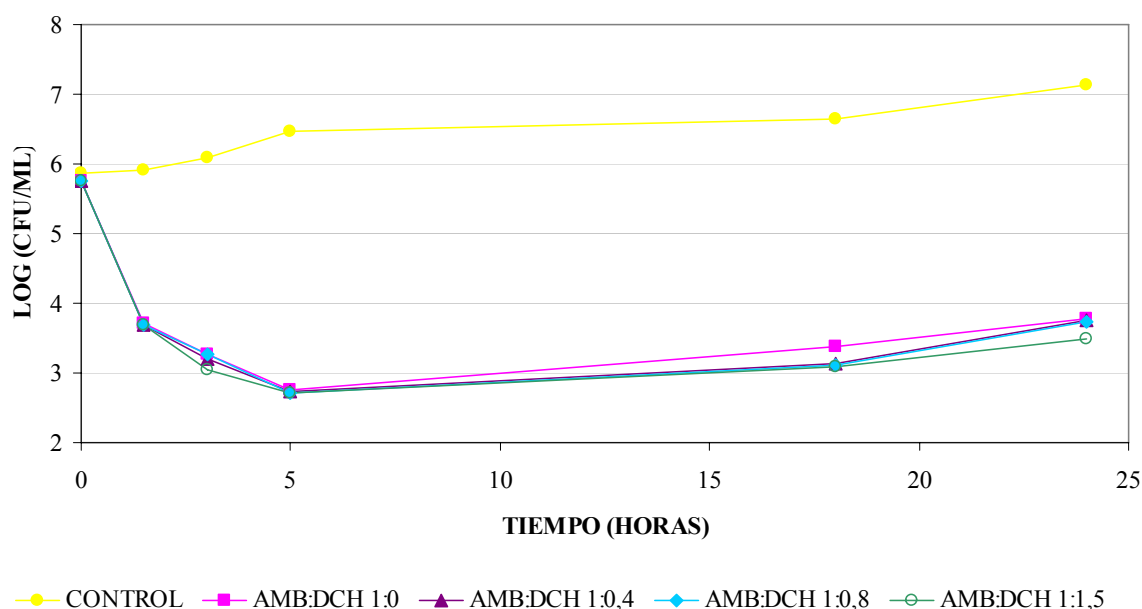


Figura 3.- Curvas de letalidad obtenidas tras administrar concentraciones de anfotericina B de 1,4*MIC en formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:0; 1:0,4; 1:0,8 y 1:1,5.

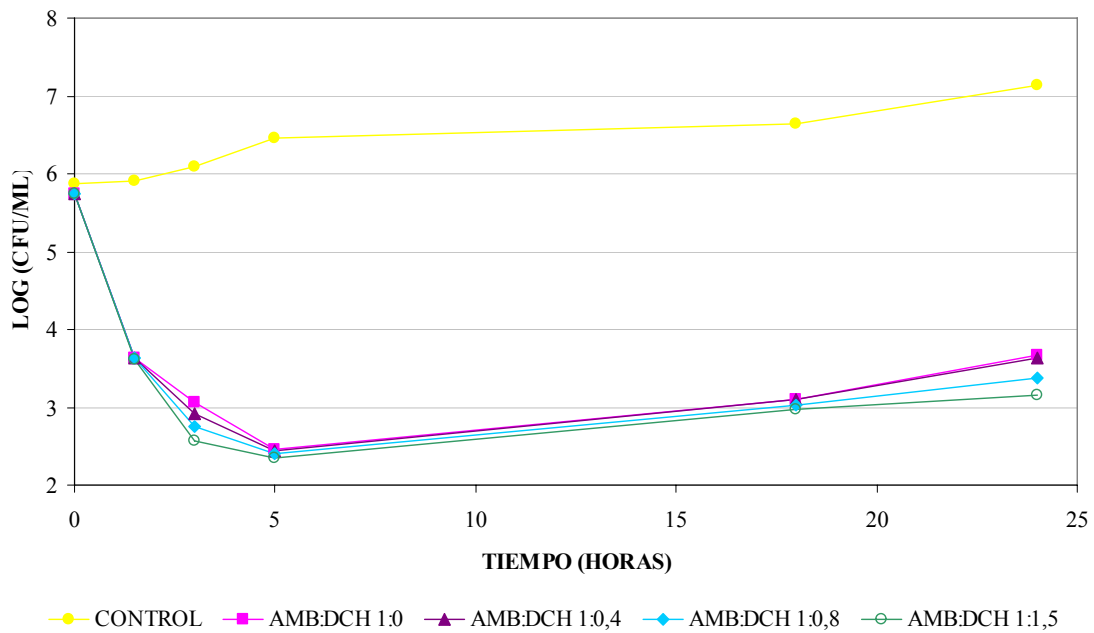


Figura 4.- Curvas de letalidad obtenidas tras administrar concentraciones de anfotericina B de 2*MIC en formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:0; 1:0,4; 1:0,8 y 1:1,5.

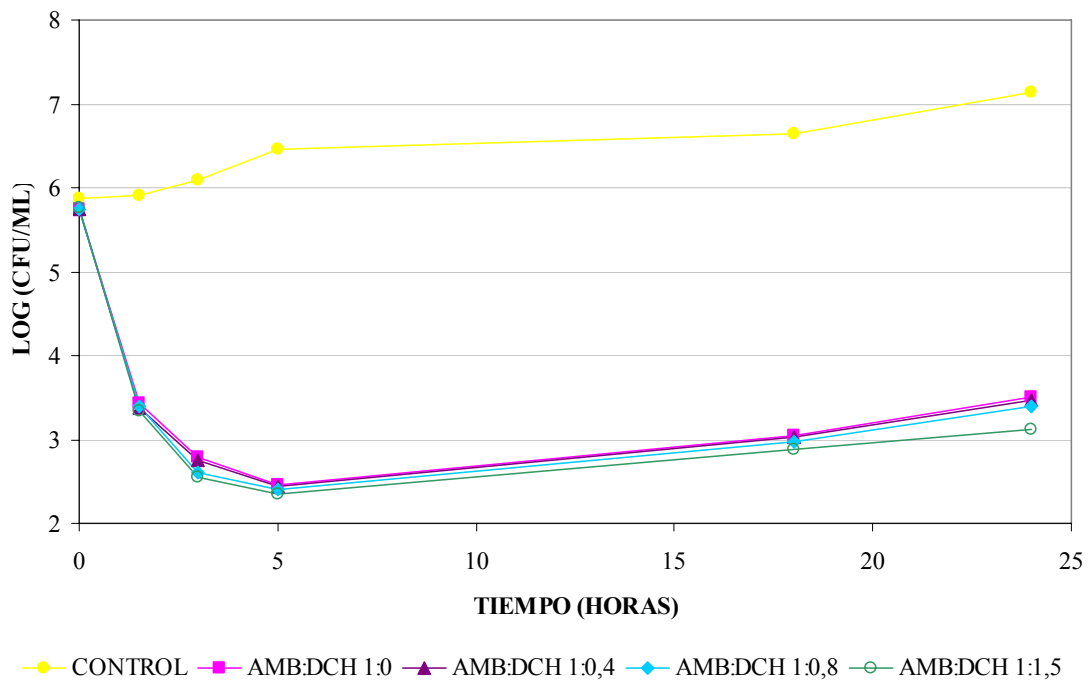


Figura 5.- Curvas de letalidad obtenidas tras administrar concentraciones de anfotericina B de 4*MIC en formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:0; 1:0,4; 1:0,8 y 1:1,5.

Este estudio muestra, además, un recrecimiento de las colonias transcurridas 18 o 24 horas para todas las formulaciones de bajas proporciones de desoxicolato de sodio cuando se administran concentraciones de anfotericina B entre 1,4 y 4 µg/ml. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Pappalardo, M.C.S.M. y col., 2009, y por Burgess, D.S. y Hastings, R.W., 2000, quienes determinaron que el recrecimiento del agente patógeno estará influenciado por las concentraciones de anfotericina B, el valor del MIC y por factores como la degradación de la anfotericina B o el proceso de resistencias.

Las Figuras 6-8 muestran las curvas de letalidad de la anfotericina B frente a *C. albicans* en presencia de mayores proporciones de desoxicolato de sodio en las distintas formulaciones. Las proporciones de anfotericina B y desoxicolato sódico estudiadas fueron 1:2; 1:3; 1:4 y 1:8. Estos estudios se realizaron a 1,4*MIC, 2*MIC y 4*MIC. En todos los casos, se observa que las curvas de letalidad son dependientes de la concentración de anfotericina B y al igual que ocurría con las formulaciones con bajas proporciones de desoxicolato de sodio, con altas proporciones de este excipiente también se observa una actividad fungicida al cabo de 1,5 horas de estudio. Por otra parte, en estas figuras (Figuras 6-8), al igual que en las gráficas anteriores (Figuras 3-5), existe un recrecimiento del número de colonias a partir de las 18 horas aunque este recrecimiento es menor cuando las proporciones de desoxicolato de sodio son superiores a 1,5.

Al carecer el desoxicolato de sodio de un efecto FICI sinérgico, la disminución del recrecimiento podría estar relacionada con que proporciones de desoxicolato de sodio superiores a 1,5 en las formulaciones disminuya el tamaño de los poliagregados y mejore la estabilidad física de la anfotericina, dificultando la aparición de mutantes, conclusiones que han sido comentadas previamente por Pappalardo, M.C.S.M. y col., 2009, Burgess, D.S. y Hastings, R.W., 2000, y Groeschke, J. y col., 2006.

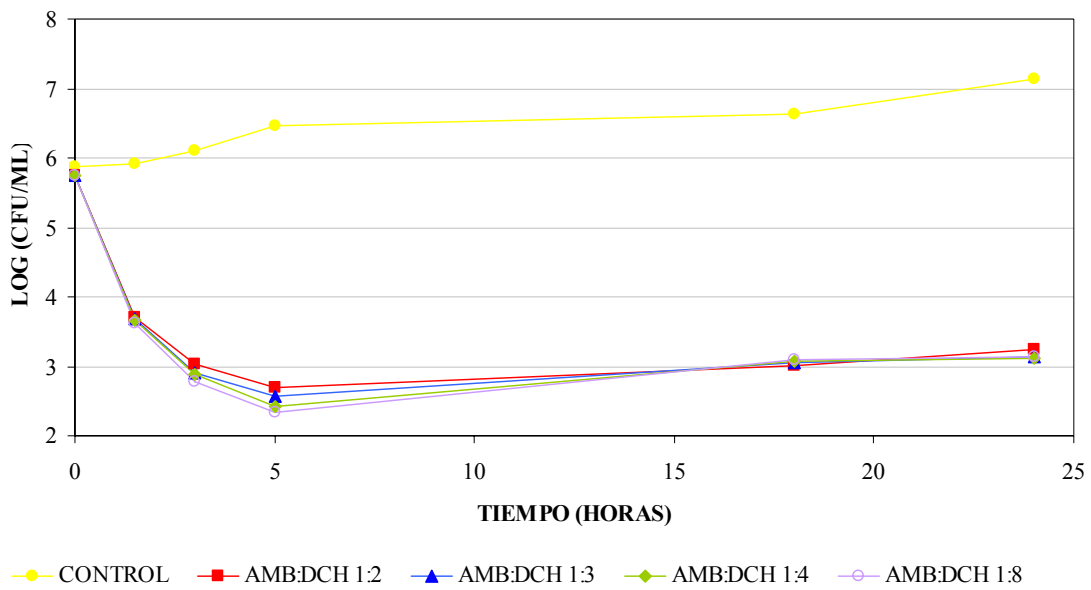


Figura 6.- Curvas de letalidad obtenidas tras administrar concentraciones de anfotericina B de 1,4*MIC en formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:2; 1:3; 1:4 y 1:8.

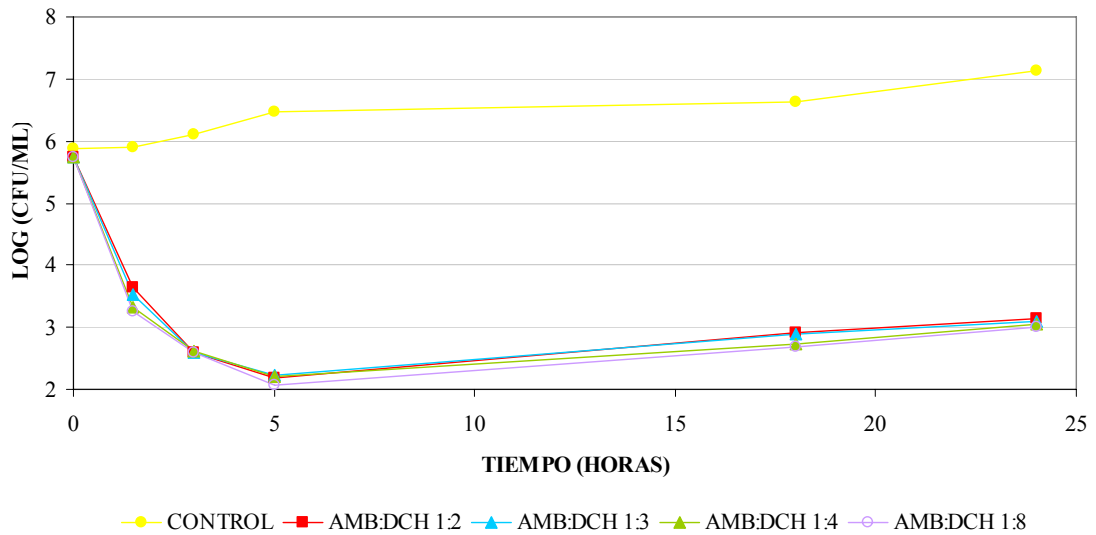


Figura 7.- Curvas de letalidad obtenidas tras administrar concentraciones de anfotericina B de 2*MIC en formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:2; 1:3; 1:4 y 1:8.

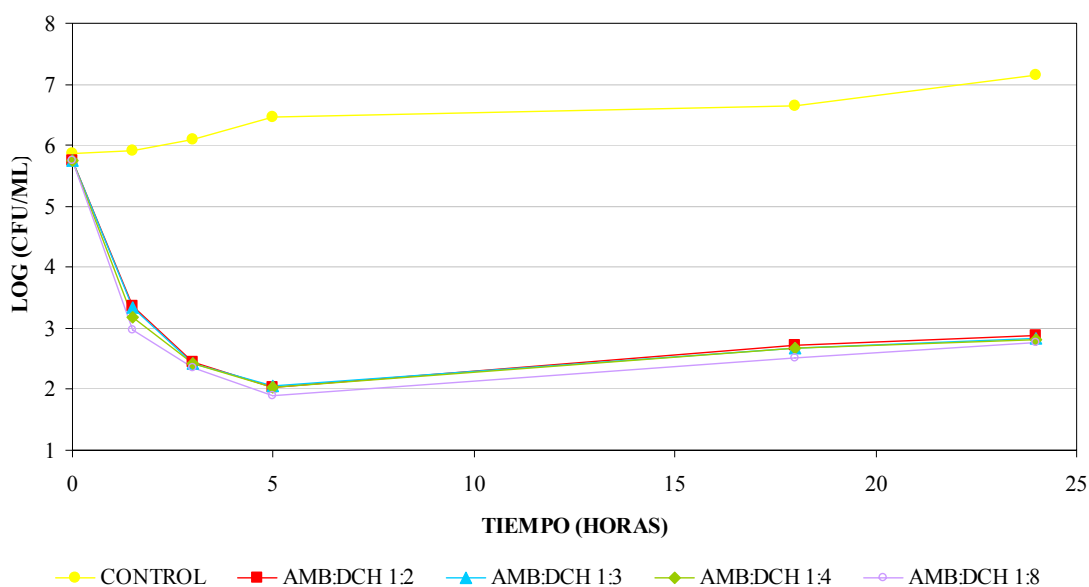


Figura 8.- Curvas de letalidad obtenidas tras administrar concentraciones de anfotericina B de 4*MIC en formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:2; 1:3; 1:4 y 1:8.

En cualquier caso, en este estudio de letalidad (Figuras 3-8) se aprecia que cuando la dosis administrada es 1,4*MIC no hay diferencias en la reducción del número de colonias cuando se comparan las distintas formulaciones con las diferentes proporciones de desoxicolato. Sin embargo, cuando la dosis es 2*MIC, a los tiempos de 3 y 5 horas, se observa un mayor efecto antifúngico si las formulaciones tienen altas proporciones de desoxicolato (Figura 7) que si tienen bajas proporciones de desoxicolato (Figura 4). Algo similar ocurre cuando la dosis es 4*MIC de forma que nuevamente a los tiempos de 3 y 5 horas, se observa un mayor efecto antifúngico si las formulaciones tienen altas proporciones de desoxicolato (Figura 8) que si tienen bajas proporciones de desoxicolato (Figura 5).

3.5.- Estudio de la actividad hemolítica de las formulaciones de anfotericina B.

Los resultados obtenidos en los estudios de la actividad hemolítica de las formulaciones objeto de estudio se muestran en la Tabla 8.

FORMULACIÓN	CONCENTRACIÓN AMB ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACIÓN DCH ($\mu\text{g/ml}$)	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA \pm S. D. (%)
AMB:DCH 1:1,5	100	150	0,032 \pm 0,005
AMB:DCH 1:2	100	200	2,500 \pm 1,426
AMB:DCH 1:4	100	400	7,983 \pm 3,478
AMB:DCH 1:8	100	800	26,050 \pm 1,482
AMB:DCH 0:2	0	200	0,008 \pm 0,002
AMB:DCH 0:8	0	800	11,349 \pm 3,456

Tabla 8.- Proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio de las formulaciones objeto de estudio, concentraciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio administrado en cada caso y media y desviación estándar de la hemólisis obtenida.

Los valores de hemólisis originados por las formulaciones de referencia, Fungizona[®] y AmBisome[®], se muestran en la Tabla 9.

FORMULACIÓN DE REFERENCIA	CONCENTRACIÓN AMB ($\mu\text{g/ml}$)	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA \pm S. D. (%)
Fungizona [®]	100	5,731 \pm 0,774
AmBisome [®]	100	0,334 \pm 0,027

Tabla 9.- Formulaciones de referencia para de estudio de la hemólisis, concentraciones de anfotericina B administrada y media y desviación estándar (S. D.) de la hemólisis.

En este estudio se puede evaluar la influencia del incremento de las proporciones de desoxicolato de sodio en la hemólisis mientras se mantiene constante la proporción de anfotericina B. De este modo, se observa una actividad hemolítica baja cuando se administran proporciones de anfotericina B y desoxicolato sódico iguales o inferiores a 1:1,5 mientras que, al administrar proporciones de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporción 1:2, 1:4 y 1:8, se obtienen valores de hemólisis de $2,500 \pm 1,426\%$, $7,983 \pm 3,478\%$ y $26,050 \pm 1,482\%$ respectivamente. Estos resultados permiten considerar que, a partir de proporciones de anfotericina B:desoxicolato de sodio 1:2, existe un efecto sinérgico del desoxicolato sódico sobre la actividad hemolítica de la anfotericina B llegando a observar valores de hemólisis muy elevados al administrar proporciones altas de desoxicolato de sodio como ocurre al administrar la formulación anfotericina B y desoxicolato sódico en proporción 1:8.

Este efecto sinérgico no se aprecia cuando las proporciones de desoxicolato sódico son menores. Es destacable señalar que el valor de hemólisis de la formulación en la que la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio es 1:1,5 fue de tan solo $0,032 \pm 0,005\%$, y por lo tanto 10 veces inferior al observado tras la administración de AmBisome[®]. Otros autores como van Etten, E.W.N. y col., 2000, también encuentran bajos niveles de hemólisis (inferiores a los de las formulaciones comerciales de referencia) al incubar una suspensión de eritrocitos únicamente con desoxicolato de sodio en una concentración de 84 mg/L.

Sin embargo, es importante indicar que, al incorporar concentraciones mayores de desoxicolato de sodio sí se aprecia un incremento de los valores de hemólisis. La utilización de formulaciones en las que la proporción de anfotericina B y desoxicolato sódico es de 0:8 muestra unos valores de hemólisis de $11,349 \pm 3,456\%$, habiendo administrado una concentración de desoxicolato de sodio de 0,80 mg/ml (800 µg/ml). Por lo tanto el aumento de los niveles de hemólisis únicamente se produce en presencia de elevadas concentraciones de desoxicolato sódico. Esta actividad hemolítica producida

por el desoxicolato sódico ha sido también previamente estudiada por Yu, B.G. y col., 1998, quienes en sus condiciones de estudio obtienen unos valores de hemólisis del 100% al administrar concentraciones de desoxicolato de sodio de 0,32 mg/ml.

La diferencia en el porcentaje de hemólisis entre ambos estudios se puede atribuir a las diferentes condiciones experimentales. Así, por ejemplo, si se observa la actividad hemolítica de la formulación comercial Fungizona en ambas experiencias se aprecia que Yu, B.G. y col., 1998, refieren valores del 100% de hemólisis para Fungizona[®] con concentraciones de anfotericina B de 3,0 µg/ml, un valor muy superior al alcanzado en nuestros ensayos (5,731 ± 0,774%) donde se administraban 100 µg/ml de anfotericina B a partir de la formulación de referencia Fungizona[®].

A la vista de estos estudios se puede considerar que en la actividad hemolítica intervienen tanto la concentración de anfotericina B como la proporción de desoxicolato de sodio incorporada en la formulación. Para la realización de este estudio, se administró siempre una concentración establecida de anfotericina B (100 µg/ml), seleccionada al observar estudios previos (Espada, R. y col, 2008a) en los que, con concentraciones inferiores de anfotericina B, los valores de hemólisis no eran lo suficientemente elevados como para poder estudiar el efecto del desoxicolato en la formulación.

Cuando se comparan las nuevas formulaciones con las comerciales de referencia, Fungizona[®] y AmBisome[®], se observa que los valores de hemólisis resultan prácticamente nulos en el caso de la formulación de AmBisome[®]. En las formulaciones objeto de estudio, en las que se mantiene constante la proporción de anfotericina B y varían las proporciones de desoxicolato sódico, el porcentaje de hemólisis aumenta al incrementarse la cantidad de desoxicolato sódico. Observándose que cuando las formulaciones de anfotericina B: desoxicolato de sodio está en proporciones menores o iguales a 1:2, los valores de hemólisis (2,500 ± 1,426%) resultan inferiores a los valores obtenidos con Fungizona[®] (5,732 ± 0,774%).

Una de las posibles causas que justifican estos buenos datos de hemólisis de las nuevas formulaciones de anfotericina B es la utilización para la elaboración de las mismas de una suspensión de anfotericina B en estado poliagregado. Sin embargo, en el caso de la Fungizona[®], los cambios de pH durante su elaboración modifican el estado de agregación de la misma que pasa a un estado dimérico que podría ser el responsable de sus mayores valores de hemólisis. La influencia del estado de agregación de la anfotericina B en la hemólisis se confirma con los trabajos de Gaboriau, F. y col., 1997 y Espada, R. y col., 2008a. En estas publicaciones se observa una disminución de los niveles de hemólisis obtenidos al exponer a las suspensiones eritrocitarias a soluciones de Fungizona[®] sometidas a calentamiento moderado, lo que se atribuye a un cambio en el estado de agregación de la anfotericina B del estado dimérico, que presenta una mayor toxicidad al compararse con el estado poliagregado.

En este estudio, al evaluar el efecto del desoxicolato sódico sobre la acción hemolítica de las nuevas formulaciones se observa que este excipiente es mucho menos hemolítico que el dimetilsulfóxido. Cuando se administran concentraciones de anfotericina B de 100 µg/ml de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporción 1:4 se alcanzan valores de $7,982 \pm 4,789\%$ mientras que Charvalos, E. y col., 2006, sólo necesitan concentraciones de 2,5 µg/ml de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido para obtener valores de hemólisis mucho más elevados (12,5%).

En el caso de la formulación de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 0:2, administrando concentraciones de desoxicolato sódico de 200 µg/ml, se obtuvieron valores de hemólisis muy bajos que justificaron prácticamente la ausencia de efectos tóxicos frente a los eritrocitos. En las asociaciones con anfotericina B, la utilización de desoxicolato sódico en concentraciones bajas (hasta 200 µg/ml) parece que el efecto hemolítico no se ve potenciado. Así, la formulación en la que la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio es 1:2 tiene un efecto hemolítico intermedio, situado

entre el presentado por las formulaciones AmBisome[®] y Fungizona[®], formulaciones actualmente administradas en la práctica clínica mientras que la administración de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporciones 1:4 presentan valores hemolíticos superiores al de la Fungizona[®] por lo que se debe evitar su uso por sus posibles efectos hemolíticos. Estos resultados nos llevan a limitar la asociación de anfotericina B: desoxicolato sódico en proporciones máximas de 1:2 para evitar los efectos sinérgicos hemolíticos no deseados.

El porcentaje de hemólisis de estas formulaciones en orden creciente sería:

AMB:DCH (1:1,5) > AMBISOME[®] > AMB:DCH (1:2) > FUNGIZONA[®] > AMB:DCH (1:4)

(-)

(+)

3.6.- Estudio de morfología y funcionalidad renal y hepática de los ratones infectados por *C. albicans* tras la administración de las formulaciones.

Uno de los hechos más significativos en los tratamientos de la candidiasis sistémica consiste en la posible alteración tanto de la funcionalidad como de la morfología de órganos fundamentales como el hígado y los riñones.

A nivel renal es importante destacar que tanto la infección por *C. albicans* como el tratamiento con anfotericina B pueden afectar a su funcionalidad. Ésta es estudiada mediante la determinación de la creatinina y el nitrógeno ureico plasmáticos.

La modificación de los parámetros de funcionalidad renal puede ir acompañada de una atrofia renal. El hecho de que exista una atrofia en uno de los riñones podrá relacionarse con un elevado grado de infección renal. En

general, los riñones morfológicamente normales presentan una longitud media de $1,20 \pm 0,14$ cm, una anchura media de $0,81 \pm 0,09$ cm y pesos medios por riñón de $0,238 \pm 0,024$ g mientras que, en el caso de aquellos animales cuya funcionalidad renal se encuentra afectada, el tamaño medio del riñón atrofiado en cuanto a longitud es de $0,95 \pm 0,10$ cm y con una anchura media de $0,60 \pm 0,12$ cm.



Figura 9.- Morfología y tamaño normal de riñones en ratón ICR.



Figura 10.- Morfología y tamaño de una pareja de riñones donde uno de ellos se encuentra atrofiado.

La alteración en la funcionalidad renal se determina como se ha comentado anteriormente mediante los valores de creatinina y nitrógeno ureico plasmáticos. En la Tabla 10 se muestran los niveles de parámetros renales a los 28 días del estudio, para los grupos control sin infección y con infección y para los grupos que recibieron las formulaciones de referencia, AmBisome[®] y Fungizona[®].

FORMULACIÓN	CREATININA SÉRICA ± S. D. (mg/dl)	NITRÓGENO URÉICO ± S.D. (mg/dl)
Control (sin infección)	0,23 ± 0,06	25,97 ± 2,55
Control (con infección)	---	---
AmBisome [®] (5 mg/kg)	0,27 ± 0,06 *	26,20 ± 7,28
Fungizona [®] (1 mg/kg)	0,30 ¹	38,90 ¹

Tabla 10.- Relación de los valores de toxicidad renal obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones de referencia. S. D. corresponde a la desviación estándar.

*Probabilidad “t student” significativa ($p < 0,05$) frente a animales control (sin infección).

¹ sólo se obtuvo muestra plasmática suficiente de un ratón.

La administración de una sola dosis de las formulaciones de referencia de Fungizona[®] y AmBisome[®] no parece ser suficiente para erradicar la infección alcanzando al final del estudio (28 días) valores de creatina sérica ligeramente más elevados que los que presenta el grupo de animales control sin infección. En cuanto a los valores de nitrógeno ureico, fueron similares en el grupo control y en los animales tratados con AmBisome[®], mientras que fueron superiores en el caso de los animales tratados con Fungizona[®]. Este resultado es importante porque indica que tras una dosis se produce un descenso en la infección evitando la muerte de los animales que se produce en un 100% en el grupo control de animales infectados y no tratados durante los 5 días siguientes a la infección.

Los grupos tratados con una sola dosis de las formulaciones de referencia muestran que la infección por *C. albicans* aumenta durante el estudio. Así, al final del mismo, existirá un importante daño renal que se refleja en valores elevados de creatinina para las dos formulaciones y de nitrógeno ureico en el caso de los animales tratados con Fungizona[®].

En la tabla 11 se muestran los valores plasmáticos de creatinina y nitrógeno ureico para las formulaciones con distintas proporciones de anfotericina B y desoxicolato en dosis de 3 y 5 mg/kg.

FORMULACIÓN	CREATININA SÉRICA ± S.D. (mg/dl)	NITRÓGENO URÉICO ± S.D. (mg/dl)
Control (sin infección)	0,23 ± 0,06	25,97 ± 2,55
AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	0,60 ± 0,25 *	66,80 ± 31,62 *
AMB:DCH 1:0,8 (5 mg/kg)	0,60 ± 0,10 *	54,70 ± 23,71
AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg)	0,40 ± 0,10 *	29,80 ± 4,21
AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg)	0,42 ± 0,13 *	29,62 ± 8,85

Tabla 11.- Relación de los valores de toxicidad renal obtenida tras la administración de dosis única de las formulaciones de referencia. S. D. corresponde a la desviación estándar.

***Probabilidad “t student” significativa ($p < 0,05$) frente a animales control (sin infección).**

Cuando se comparan los valores de creatinina de esta formulación (1:0,8) tanto a dosis de 3 como de 5 mg/kg, con los menores valores de creatinina (0,40-0,42 mg/dl) que presenta la formulación con proporciones mayores de desoxicolato 1:1,5 se aprecia una clara diferencia que se puede atribuir a la existencia de una mayor disminución de la colonización renal cuando se emplean dosis elevadas de desoxicolato en la formulación (1:1,5), tardando más en producirse niveles elevados de reinfección capaces de producir una severa alteración de los parámetros renales. La elevada variabilidad en los valores del nitrógeno ureico obtenidos tras la administración de las nuevas formulaciones dificulta que se encuentren diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se comparan con el grupo control. En cualquier caso, se observa tras la administración de la formulación AMB:DCH 1:0,8 se aprecian unos mayores valores tanto de nitrógeno ureico como de creatinina sérica.

Los valores de creatinina y nitrógeno ureico alcanzados tras la administración de dosis de 3 y 5 mg/kg de anfotericina B de una formulación donde la proporción de sustancia activa y el desoxicolato de sodio es de 1:1,5 muestran valores más próximos a la normalidad. Estos valores son similares a los obtenidos por Fielding, R.M. y col., 1992, y a los de Espada, R. y col., 2008b. En nuestro estudio la administración de una única dosis de 3 o 5 mg/kg,

no produce daños a nivel de necrosis tubular. De forma similar Bekersky, I. y col., 1999, encuentran que la alteración de los parámetros renales, en perros beagles, son dosis dependientes de manera que la administración de dosis superiores a 4 mg/kg/día de AmBisome® durante 30 días muestran alteraciones moderadas mientras que, al administrar dosis de 16 mg/kg/día, cursan con necrosis renal.

Además del estudio de la funcionalidad renal, se procedió al estudio de la funcionalidad hepática analizando las enzimas hepáticas AST (también llamada GOT), y la ALT (o GPT) en las formulaciones de referencia indicadas en la Tabla 12.

FORMULACIÓN	AST ± S. D. (UI/l)	ALT ± S. D. (UI/l)
Control (sin infección)	108,00 ± 5,57	39,33 ± 6,03
Control (con infección)	---	---
AmBisome® (5 mg/kg)	153,33 ± 21,08 *	62,67 ± 20,01
Fungizona® (1 mg/kg)	120,000 ¹	53,000 ¹

Tabla 12.- Relación de los valores de toxicidad hepática obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones de referencia. S. D. corresponde a la desviación estándar.

*Probabilidad "t student" significativa ($p < 0,05$) frente a animales control (sin infección).

¹ sólo se obtuvo muestra plasmática suficiente de un ratón.

El valor de la enzima hepática AST del grupo tratado con AmBisome® (5 mg/kg) es significativamente diferente ($p < 0,05$) que el del grupo control.

En la tabla 13 se muestran los valores de las enzimas hepáticas tras la administración de una única dosis de 3 mg/kg ó 5 mg/kg de anfotericina B en el tratamiento de la candidiasis en las formulaciones de sustancia activa y desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8 y 1:1,5.

FORMULACIÓN	AST ± S. D. (UI/I)	ALT ± S. D. (UI/I)
Control (sin infección)	108,00 ± 5,57	39,33 ± 6,03
AMB:DCH 1:0,8 3 mg/kg	174,75 ± 31,37 *	76,33 ± 3,06 *
AMB:DCH 1:0,8 5 mg/kg	109,67 ± 3,94	50,67 ± 10,97
AMB:DCH 1:1,5 3 mg/kg	155,00 ± 59,03	68,67 ± 19,55
AMB:DCH 1:1,5 5 mg/kg	106,00 ± 6,22	54,80 ± 4,76 *

Tabla 13.- Relación de los valores de toxicidad hepática obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones de referencia. S. D. corresponde a la desviación estándar.

***Probabilidad “t student” significativa (p< 0,05) frente a animales control (sin infección).**

La administración de dosis de 5 mg/kg de anfotericina B en las formulaciones con proporciones de anfotericina B y desoxicolato 1:0,8 y 1:1,5 permite obtener menores valores de enzimas hepáticas (AST y ALT) frente a la administración de las mismas formulaciones a una dosis inferior (3 mg/kg). Esto podría ser debido a la disminución de la colonización hepática por candidiasis cuando se administran dosis de anfotericina B en forma poliagregada con desoxicolato de sodio de 5 mg/kg. La existencia de una relación entre la disminución de la colonización hepática y la mejora de estos parámetros hepáticos ha sido observada en trabajos previos (Espada, R. y col., 2008b).

3.7.- Estudio de supervivencia de los ratones infectados por *C. albicans* tras la administración de las formulaciones.

Los valores de supervivencia de los grupos control se expresan en la Tabla 14.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE SUPERVIVIENTES	PORCENTAJE DE SUPERVIVIENTES
Control (sin infección)	0/4	0
AmBisome® (5 mg/kg)	4/4	100
Fungizona® (1 mg/kg)	1/4	25

Tabla 14.- Valores de supervivencia en valor absoluto y en porcentaje obtenidos en los grupos que han recibido las formulaciones de referencia.

Los resultados de supervivencia obtenidos con las distintas formulaciones en ratones inoculados con 0,2 ml de se indican en la Tabla 15.

TRATAMIENTO	Nº SUPERVIVIENTES	TASA DE SUPERVIVENCIA (%)
AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	4/7	57,14
AMB:DCH 1:0,8 (5 mg/kg)	3/7	42,86
AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg)	2/7	28,57
AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg)	5/7	71,43

Tabla 15.- Valores de supervivencia en valor absoluto y en porcentaje obtenidos en los grupos que han recibido las formulaciones objeto de estudio.

La formulación que presenta un mayor índice de supervivencia frente a la infección por *Candida albicans* corresponde a la administración de una dosis de 5 mg/kg de anfotericina B administrada en una proporción de sustancia activa frente al desoxicolato de sodio de 1:1,5.

El porcentaje de supervivencia al final del estudio para los distintos tratamientos se muestra en la Figura 11.

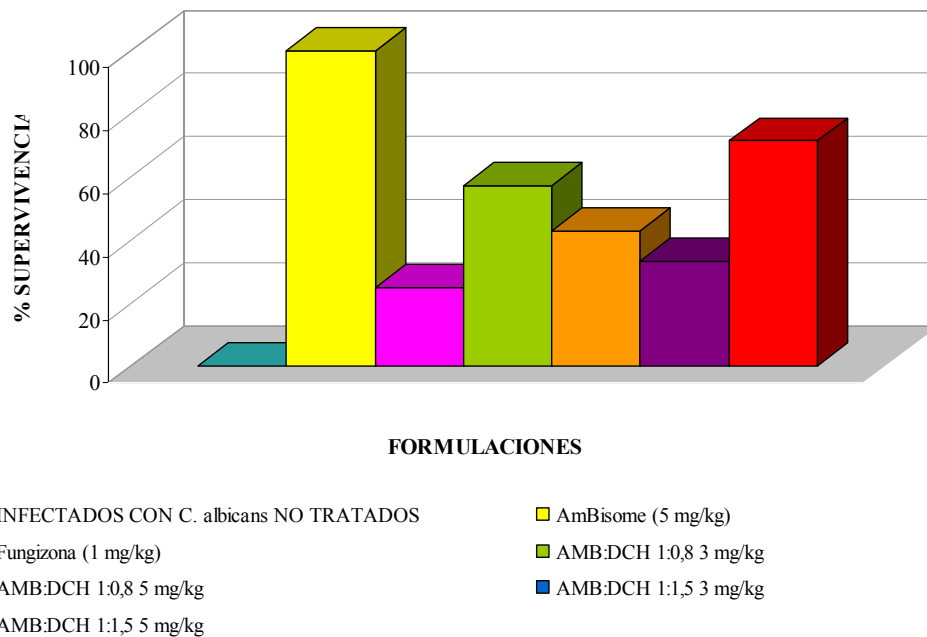


Figura 11.- Tasa de supervivencia de los ratones macho ICR al final del ensayo de dosis única tras la administración de las formulaciones control y de las formulaciones objeto de estudio.

Los resultados de supervivencia diaria de los distintos grupos de ratones macho ICR tanto en los grupos control como en los de las formulaciones desarrolladas se muestran en la Figura 12.

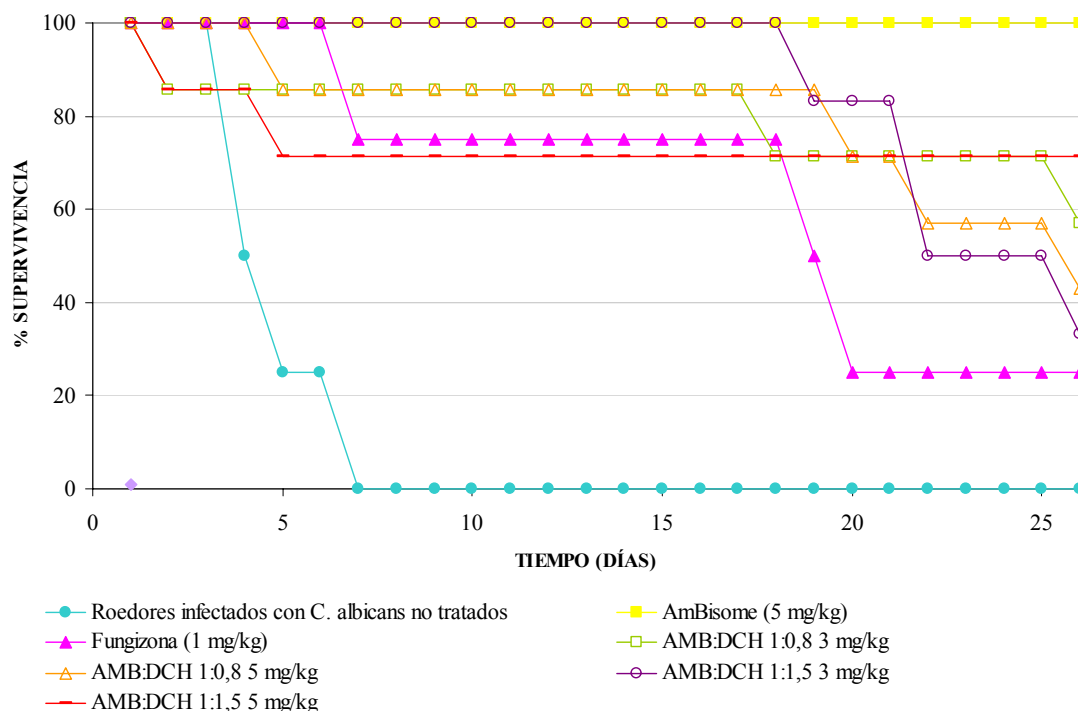


Figura 12.- Gráfica de supervivencia diaria de los ratones macho ICR al final del ensayo de dosis única tras la administración de las formulaciones control y de las formulaciones objeto de estudio.

Todas las formulaciones objeto de estudio, en las que se administran dosis de 3 y 5 mg/kg de anfotericina B, presentan un índice de supervivencia mayor al que presenta la formulación comercial Fungizona[®] hecho que se debe atribuir al diferente estado de agregación de la anfotericina B. No obstante, se pudo apreciar, entre el día 18 y el 21 desde el inicio del tratamiento, un descenso de la supervivencia tanto tras la administración de 1 mg/kg de Fungizona[®] como tras la administración de 3 y 5 mg/kg de anfotericina B en las formulaciones en las que la proporción de sustancia activa frente al desoxicolato de sodio fue de 1:0,8 y 1:1,5 , excepto en la formulación 1:1,5 administrada a una dosis de 5 mg/kg (ver Figura 12). Dicha formulación 1:1,5 a la dosis de 5 mg/kg es por lo tanto la única de las nuevas formulaciones poliagregadas de anfotericina B que no presenta un descenso en la supervivencia de los animales a partir del día 5 del ensayo. Únicamente la administración de AmBisome[®] a esta misma dosis mejora este resultado de supervivencia.

Los valores obtenidos tanto en la supervivencia diaria como en la supervivencia al final del ensayo se ven complementados con los valores obtenidos del cálculo de supervivencia media (MST) de los grupos de referencia y de aquellos grupos que recibieron tratamiento con las formulaciones en estudio.

Los resultados de supervivencia media (Mean Survival Time o MST) obtenidos en los grupos control se muestran en la Tabla 16.

FORMULACIONES	MST \pm S. D. (días)	Nº RATONES
		SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
Control (con infección)	3,00 \pm 1,41	0/4
Ambisome [®] (5 mg/kg)	>26 (0)	4/4
Fungizona [®] (1 mg/kg)	16,50 \pm 8,66	1/4

Tabla 16.- Tiempos medios de supervivencia de las formulaciones de referencia obtenidos al final el ensayo.

S. D. corresponde a la desviación típica obtenida tras la administración de las distintas formulaciones.

En Tabla 17 se muestran los tiempos medios de supervivencia obtenidos tras la administración de formulaciones en estudio a ratones infectados con *Candida albicans*.

FORMULACIONES	MST \pm S. D. (días)	Nº RATONES
		SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	20,71 \pm 9,43	4/7
AMB:DCH 1 0,8 (5 mg/kg)	20,43 \pm 8,32	3/7
AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg)	22,17 \pm 3,71	2/7
AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg)	19,14 \pm 11,72	5/7

Tabla 17.- Tiempos medios de supervivencia de las formulaciones de referencia obtenidos al final del ensayo.

S. D. corresponde a la desviación típica obtenida tras la administración de las distintas formulaciones.

La supervivencia de los roedores tras la administración de 3 y 5 mg/kg de anfotericina B en formulaciones donde la sustancia activa se encuentra en proporciones de 1:0,8 y 1:1,5 respecto al desoxicolato sódico resultó ser superior a la obtenida tras la administración de 1 mg/kg de Fungizona® e inferior a la obtenida tras la administración de 5 mg/kg de AmBisome®.

La administración de la formulación AMB:DCH 1:0,8 presenta similares valores de MST para las dosis de 3 y 5 mg/kg. Sin embargo los valores de MST de la formulación con mayor proporción de desoxicolato (AMB:DCH 1:1,5) administrada a una dosis de 5 mg/kg es inferior (19,143 días) aunque la supervivencia de los animales al cabo de 28 días es mayor. Este menor valor de MST se debe a que las muertes de los dos animales se produjeron en los primeros días del estudio y sin que el tratamiento con la anfotericina B fuese efectivo contra los niveles de infección que presentaban estos animales.

3.8.- Estudio de colonización a nivel renal y cerebral por *Candida albicans*.

Uno de los parámetros para determinar la erradicación de la infección consiste en la determinación de la colonización del cerebro y de los riñones por parte de *C. albicans*, órganos por los que tiene mayor afinidad. Ésta será expresada en unidades logarítmicas de unidades formadoras de colonias por gramo de órgano (cfu/g).

La colonización cerebral por parte de *C. albicans* va acompañada de síntomas característicos como andar errático así como una ligera inclinación de la cabeza.

En el caso de las formulaciones de referencia, AmBisome® y Fungizona®, éstas presentan un aclaramiento total de la infección a nivel cerebral. En el caso del tratamiento con Fungizona® es de destacar que este aclaramiento

total a nivel cerebral se ha producido en el único animal que ha sobrevivido en el estudio por lo que este dato debe ser tomado con precaución. En el caso de la nueva formulación de anfotericina B (AMB:DCH 1:0,8) administrada a dosis de 3 y 5 mg/kg se obtuvo un aclaramiento de la infección del 75% y 66,7% respectivamente alcanzando en los animales infectados niveles de colonización de $3,201 \pm 0,262$ y $2,121 \pm 0,242$ log cfu/g.

En el caso de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:1,5, se obtiene un aclaramiento total de la infección cerebral en el 80% de los roedores tratados tras administrar la dosis de 5 mg/kg. Sin embargo, la administración de una dosis de 3 mg/kg de esta formulación (AMB:DCH 1:1,5) es insuficiente para erradicar la infección a nivel cerebral. Los niveles de colonización cerebral en los animales infectados fueron de $2,121 \pm 0,304$ y $2,272 \pm 0,213$ log cfu/g para las dosis de 5 y 3 mg/kg respectivamente.

Por lo tanto las nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B y desoxicolato de sodio son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y conseguir una elevada erradicación de la candidiasis a nivel cerebral especialmente cuando las dosis administradas fueron de 5 mg/kg.

Otro de los factores analizados fue la infección renal por *C. albicans*. Los niveles de colonización renal de las formulaciones de referencia se muestran en la Tabla 18.

TRATAMIENTO	Lg ₁₀ CFU/g ± desviación estándar
AmBisome [®]	$4,862 \pm 1,474$ ¹
Fungizona [®]	$5,655$ ²

Tabla 18.- Colonización renal de ratones ICR machos infectados por *Candida albicans* tras el tratamiento en dosis única con las formulaciones de referencia, expresada en unidades logarítmicas. S. D. corresponde a la desviación estándar.

¹ El 50% de los roedores ha presentado un aclaramiento total del patógeno a nivel renal. Estos roedores no se han incluido en la media.

² sólo un animal llegó al final del estudio.

Los valores de colonización renal expresados en unidades logarítmicas, de las formulaciones objeto de estudio se expresan en la Tabla 19.

TRATAMIENTO	Lg ₁₀ CFU/g ± desviación estándar
AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	6,079 ± 0,319
AMB:DCH 1:0,8 (5 mg/kg)	5,458 ± 1,563
AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg)	5,973 ± 0,041
AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg)	5,951 ± 0,507

Tabla 19.- Colonización renal de ratones ICR machos infectados por *Candida albicans* tras el tratamiento en dosis única con las formulaciones objeto de estudio, expresada en unidades logarítmicas.

S. D. corresponde a la desviación estándar.

La administración de 3 y 5 mg/kg de anfotericina B en formulaciones donde las proporciones de sustancia activa frente al desoxicolato de sodio fueron de 1:0,8 y 1:1,5 presentaron niveles de colonización renal próximos a 6 unidades logarítmicas al final del estudio. Estos resultados permiten considerar que tras el tratamiento, los animales en todos los grupos muestran un proceso de reinfección llegando a alcanzar los valores máximos que produce la muerte de los animales a partir del día 18 postratamiento. Autores como Andes, D. y col., 2006, demostraron que únicamente la administración de dosis elevadas de anfotericina B liposómica (4 mg/kg) y en forma de complejo lipídico (20 mg/kg) produce sólo una reducción del orden de $10^{1,0}$ - $10^{0,9}$ cfu a las 12 horas de la administración del tratamiento. Estos estudios muestran que el elevado nivel de infección inicial obliga a la administración de dosis múltiples para evitar posteriores incrementos en los niveles de colonización renal.

4.- DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos indican que *Candida albicans* SC5314 es sensible al tratamiento con anfotericina B, alcanzando niveles de MIC de 1,0 mg/L, valores similares a los que obtienen Ernst E.J. y col., 2000.

Las formulaciones con proporciones crecientes de desoxicolato sódico permiten evaluar la influencia de la adición de este tensioactivo en el efecto post-antifúngico (PAFE) de la anfotericina B. Estos tiempos post-antifúngicos prolongados ya habían sido observados por otros autores a partir de 1,0*MIC de anfotericina B y son importantes ya que otros agentes fungistáticos como el itraconazol y el posaconazol no tienen valores de PAFE prolongados frente a *C. albicans* (Manavathu, E.K. y col., 2004).

En este trabajo se ha evaluado la influencia de concentraciones de anfotericina B entre 1,4 y 4,0 veces la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la anfotericina B en su efecto postantifúngico. Los resultados del PAFE obtenidos para las distintas formulaciones con desoxicolato de sodio muestran que independientemente de la proporción de desoxicolato de sodio presente en las formulaciones todas ellas presentan valores de PAFE de 18 horas cuando la concentración estudiada fue de 1,4 *MIC. Sin embargo cuando las concentraciones estudiadas fueron de 2,0*MIC se aprecia un efecto aditivo de la anfotericina B y el desoxicolato de sodio cuando la proporción de desoxicolato de sodio es igual o superior a 2 (AMB:DCH 1:2; AMB:DCH 1:3; y AMB:DCH 1:4). En este estudio es importante destacar que cuando las concentraciones estudiadas fueron 4,0*MIC el PAFE se hace igual o superior a 24 h en todas las formulaciones que contienen desoxicolato de sodio, mientras que la ausencia de este excipiente en la formulación hace descender el PAFE a $22,00 \pm 3,46$ h. Este efecto aditivo observado en el PAFE de las formulaciones de poliagregados de anfotericina B es fundamental para un adecuado diseño de los regimenes posológicos de forma que se deberían administrar dosis que

permitan alcanzar concentraciones $\geq 4 \mu\text{g/g}$ en los órganos afectados para evitar reinfecciones si las dosis se administran cada 24 h.

En las curvas de letalidad se observa que concentraciones elevadas de $4 \times \text{MIC}$ permiten alcanzar antes la actividad fungicida, sin que sus resultados se vean modificados cuando la anfotericina B y el desoxicolato de sodio se encuentran en proporciones de 1:0; 1:0,4 y 1:0,8, alcanzándose a tiempos cortos (1,5-5 h) la actividad fungicida, tiempos similares a los alcanzados en trabajos realizados por Keele, D.J. y col., 2001.

Al realizar las curvas de letalidad con las proporciones de desoxicolato de sodio más elevadas (1:2; 1:3; 1:4 y 1:8), se observa una mayor actividad fungicida para tiempos cortos (1,5–5h) a medida que aumenta la proporción de desoxicolato en la formulación, se observa además un menor en el proceso de recrecimiento cuando la proporción de desoxicolato es igual o superior a 1,5, resultados similares a los obtenidos por Pappalardo, M.C.S.M. y col., 2009 y Burgess, D.S. y Hastings, R.W., 2000.

En los estudios de hemólisis se observan diferencias en los valores de porcentajes obtenidos en diferentes trabajos de otros autores, por lo que en el presente trabajo se incluyen, para este estudio, las formulaciones comerciales de referencia Fungizona[®] y de AmBisome[®] lo que permite comparar los resultados de hemólisis con los obtenidos en por otros autores. En este estudio se observa que la utilización de desoxicolato sódico en concentraciones bajas (hasta 200 $\mu\text{g/ml}$) parece no potenciar el proceso hemolítico. Cuando las proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio son de 1:2 se obtiene un efecto hemolítico intermedio, situado entre el presentado por las formulaciones AmBisome[®] y Fungizona[®], formulaciones actualmente administradas en la práctica clínica, resultado lógico si se tiene en cuenta que en las nuevas formulaciones desarrolladas en este trabajo, la anfotericina B se encuentra en forma poliagregada similar a la que presenta la formulación de AmBisome[®], mientras que la Fungizona[®], al encontrarse en forma dimérica tendrá un mayor efecto hemolítico. Por otra parte, es importante destacar que

existe un importante incremento del efecto hemolítico cuando la proporción de desoxicolato en la formulación se incrementa, alcanzándose en la formulación de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporciones 1:4 valores de hemólisis superiores a los obtenidos tras la administración de Fungizona® por lo que esta proporción ya tendría limitado su utilización por su mayor efecto hemolítico.

Los valores de funcionalidad renal determinados mediante la creatinina sérica y el nitrógeno ureico muestran que cuando se alcanzan niveles elevados de infección por *C. albicans*, aumentan estos parámetros bioquímicos, deteriorándose rápidamente la funcionalidad renal y provocando como consecuencia la muerte del animal infectado. Los tratamientos con una sola dosis inicial, permiten comparar las diferencias entre las distintas formulaciones mediante los resultados de creatinina plasmática. Las diferencias en los valores de creatinina al final del estudio entre las formulaciones con proporciones de anfotericina B desoxicolato 1:0,8 y 1: 1,5 son indicativas de las distintas eficacias que presenta cada formulación. Así la formulación 1:1,5 con dosis de 3 y 5 mg/kg presenta valores de creatinina inferiores a los recogidos tras la administración de la formulación de anfotericina B y desoxicolato 1:0,8. Esto puede ser atribuido a que la formulación con mayor proporción de desoxicolato (1:1,5) es más eficaz disminuyendo el grado de colonización renal tras la administración del tratamiento y por lo tanto en estos animales se tarda más en alcanzar un grado de reinfección capaz de aumentar los niveles de creatinina plasmática. Resultados similares son encontrados en las enzimas hepáticas con valores al final del estudio, de AST y ALT para la formulación 1:1,5 administrada a una dosis de 3 mg/kg menores que los que aparecen cuando la formulación administrada presenta una proporción de anfotericina B y desoxicolato 1:0,8 a esa misma dosis. Los valores de los parámetros plasmáticos tras la administración de la formulación 1:1,5 a dosis de 5 mg/kg no difieren significativamente de los observados en el grupo control ($p < 0,05$). Estos resultados se relacionan con una mayor eficacia antifúngica a nivel renal y hepático y con los resultados obtenidos en las curvas de letalidad (Figuras 3-5). En estas figuras se aprecia que a las 24 horas post-administración la

formulación AMB:DCH 1:1,5 muestra un menor recrecimiento de la infección. Esta formulación posiblemente facilita su penetración a través de las membranas biológicas aumentando sus concentraciones en distintos órganos.

Los estudios de supervivencia tras una dosis única es un método rápido para conocer si las diferencias farmacotécnicas observadas entre las distintas formulaciones tienen influencia sobre la eficacia de las mismas. El modelo utilizado emplea altas concentraciones de infección inicial que permite reproducir los estados finales de una infección generalizada por *C. albicans*. En nuestro modelo tras la infección inicial se produce una rápida proliferación observándose a los 3 días una elevada nefrotoxicidad que produce la muerte en el 10 % de los animales, y que causa la muerte de todos los animales antes de los 5 días si no reciben tratamiento adecuado. A los 3 días los animales presentan una infección severa, con valores de colonización renal próximos a 6 log cfu/g, destacando la aparición de una candidiasis cerebral con valores de colonización cercanos a 3 log cfu/g. Debido al elevado grado de infección se produce la muerte de algunos animales durante los 5 primeros días postratamiento. Es necesario destacar que la muerte de estos animales se debe en la mayoría de los casos al alto grado de infección inicial, siendo independientes del tratamiento al que han sido sometidos. La muerte de los animales en la última etapa del tratamiento se puede atribuir a la aparición de una reinfección en el animal. De forma que es necesario relacionar el porcentaje de animales muertos y el día de su muerte con los niveles de eficacia antifúngica después de un único tratamiento y la velocidad de reinfección postratamiento (ver resultados de los estudios de colonización renal y cerebral).

Los tiempos de supervivencia medios para las distintas formulaciones, al corregir los resultados mediante la inclusión solo de los datos obtenidos a partir del día 5 postratamiento se muestran en las tablas 20 y 21.

FORMULACIONES	MST \pm S. D.(días)	Nº RATONES
		SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
<i>C. albicans</i> sin tratamiento	3,00 \pm 1,41	0/3
Ambisome [®] (5 mg/kg)	>26	4/4
Fungizona [®] (1 mg/kg)	16,50 \pm 8,66	1/4

Tabla 20. Tiempos de supervivencia medios (MST \pm S.D. días) y nº ratones supervivientes/ nº ratones iniciales para las formulaciones de referencia (valores entre el día 5 y 26).

FORMULACIONES	MST \pm S. D.(días)	Nº RATONES
		SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
AMB: DCH 1: 0,8 (3 mg/kg)	24,17 \pm 3,60	4/6
AMB: DCH 1: 0,8 (5 mg/kg)	23,33 \pm 3,50	4/6
AMB: DCH 1: 1,5 (3 mg/kg)	22,17 \pm 3,71	2/6
AMB: DCH 1: 1,5 (5 mg/kg)	>26	5/6

Tabla 21. Tiempos de supervivencia medios (MST \pm S. D.días) y nº ratones supervivientes/ nº ratones iniciales para las distintas formulaciones (valores entre el día 5 y 26).

En este estudio se observa que, tras la administración de dosis de 3 mg/kg en las formulaciones de anfotericina B:desoxicolato (1:0,8 y 1:1,5) no se aprecian diferencias entre ambas formulaciones aunque muestran mejoras respecto a los obtenidos en la administración de una formulación comercial de Fungizona[®]. Además estas formulaciones de poliagregados presentan tiempos de supervivencia medios superiores a los que se obtienen en sistemas microparticulares de los trabajos previos de Espada y col. (2008b). En ambos trabajos como tras los tratamientos con Fungizona[®] se obtienen valores de tiempos medios de supervivencia similares, lo que permite considerar que estos estudios en dosis única pueden ser útiles para conocer el futuro comportamiento de nuestras formulaciones (1:0,8 y 1:1,5) en tratamientos con dosis repetidas. Sin embargo, cuando se administran dosis de 5 mg/kg, se

observan diferencias en los tiempos medios de supervivencia en función de la cantidad del tensioactivo que presenta cada formulación. Así, proporciones bajas de desoxicolato en la formulación (1:0,8) con dosis de 5 mg/kg, no mejora los tiempos medios de supervivencia respecto a la dosis de 3 mg/kg, mientras que mayores proporciones de desoxicolato en la formulación (1:1,5) permiten obtener estructuras micelares que contiene poliagregados de anfotericina B que aumentan la concentración del fármaco en los órganos afectados por la candidiasis. La administración de dosis altas (5 mg/kg) en esta formulación AMB:DCH 1:1,5 origina importantes mejoras en los tiempos medios de supervivencia, alcanzándose valores de MST similares a los obtenidos tras la administración de AmBisome[®] a dosis similares (5 mg/kg).

En los estudios de colonización a nivel renal, las formulaciones estudiadas AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 presentan al final del estudio valores cercanos a 6 log cfu/g. Por lo tanto una única dosis de estas formulaciones es insuficiente para la erradicación de la infección a nivel renal, por lo que deben estudiarse regimenes posológicos de dosis múltiples. El hecho de que los mayores valores de MST se obtiene con las dosis más altas (5 mg/kg) de la formulación AMB:DCH 1:1,5 sugiere que esta formulación debe ser estudiada en dosis múltiples.

En los estudios de colonización a nivel cerebral, la formulación de referencia, AmBisome[®] (5 mg/kg) presenta un aclaramiento total de la infección a nivel cerebral. La administración de dosis de 3 mg/kg de anfotericina B poliagregada no consigue una erradicación cerebral total de la infección. Con esta dosis la formulación AMB:DCH 1:0,8 se alcanzan aclaramientos totales de la infección en un 75% de los animales, mientras que esta misma dosis es insuficiente para erradicar la candidiasis cerebral cuando se ensaya la formulación AMB:DCH 1:1,5. En los estudios realizados con dosis de 5 mg/kg de anfotericina B poliagregada se observa que la formulación AMB:DCH 1:0,8 muestra un aclaramiento total de la infección cerebral en el 66,67% de los animales, llegando al 80% de los animales cuando la proporción de desoxicolato aumenta a proporciones 1:1,5. En todos los animales sin

aclaramiento total, los valores de colonización cerebral se encuentran entre 3,201 - 2,121 log cfu/g, con independencia de la dosis y la proporción de desoxicolato en la formulación. Estos resultados de erradicación cerebral de la candidiasis con estas nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B son muy esperanzadores ya que muy pocas formulaciones de anfotericina B son capaces de obtener tan buenos resultados de eficacia a nivel cerebral.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- An M, Shen H, Cao Y, Zhang J, Cai Y, Wang R y Jiang Y. 2009. "Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*". *International Journal of Antimicrobial Agents* 33:258-263.
- Andes D, Safdar N, Marchillo K y Conklin R. 2006. "Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of amphotericin B (AMB) and two lipid-associated AMB preparations, liposomal AMB and AMB lipid complex, in murine candidiasis models". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:674-684.
- Bekersky I, Boswell GW, Hiles R, Fielding RM, Buell D and Walsh TJ. 1999. "Safety and toxicokinetics of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome®) in beagle dogs". *Pharmaceutical Research* 16:1694-1701.
- Burgess DS y Hastings RW. 2000. "A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 38:87-93.
- Charvalos E, Tzatzarakis MN, van Bambeke F, Tulkens PM, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN and Mingeot-Leclercq MP. 2006. "Water-soluble amphotericin B-polyvinylpyrrolidone complexes with maintained antifungal activity against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. and reduced haemolytic and cytotoxic effects". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57:236-244.
- Chryssanthou E, Loebig A y Sjölin J. 2008. "Post-antifungal effect of amphotericin B and voriconazole against germinated *Aspergillus fumigatus* conidia". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:1309-1311.

- Ernst EJ, Klepser ME y Pfaller MA. 2000. "Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1108-1111.
- Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP and Torrado JJ. 2008a. "Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations". *International Journal of Pharmaceutics* 361:64-69.
- Espada R, Valdespina S, Molero G, Dea MA, Ballesteros MP y Torrado JJ. 2008b. "Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B". *International Journal of Antimicrobial Agents* 32:55-61.
- Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bolás F y Torrado JJ. 2008c. "*In vivo* distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:1125-1131.
- Espuelas MS, Legrand P, Campanero MA, Appel M, Chéron M, Gamazo C, Barratt G and Irache JM. 2003. "Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:419-427.
- van Etten EWM, van Vianen W, Roovers P and Frederik P. 2000. "Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, *in vitro* activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1598-1603.

- Fielding RM, Singer AW, Wang LH, Barbar S y Guo LSS. 1992. "Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:299-307.
- Gaboriau F, Chéron M, Petit C and Bolard J. 1997. "Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:2345-2351.
- García A, Adler–Moore JA y Proffitt RT. 2000. "Single-dose AmBisome (Liposomal Amphotericin B) as Prophylaxis for Murine Systemic Candidiasis and Histoplasmosis". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:2327-2332.
- Groeschke J, Solassol I, Bressolle F y Pinguet F. 2006. "Stability of amphotericin B and nystatin in antifungal mouthrinses containing sodium hydrogen carbonate". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42:362-366.
- Keele DJ, DeLallo VC, Lewis RE, Ernst EJ y Klepser ME. 2001. "Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 41:121-126.
- Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH and Pfaller MA. 1997. "Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:1392-1395.

- Kwong EH, Ramaswamy M, Bauer EA, Hartsel SC y Wasan KM. 2001. "Heat Treatment of Amphotericin B Modifies Its Serum Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Renal Toxicity following Administration of a Single Intravenous Dose to Rabbits". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2060-2063.
- Larabi M, Pages N, Pons F, Appel M, Gulik A, Schlatter J, Bouvet S y Barratt G. 2004. "Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:81-88.
- Manavathu EK, Ramesh MS, Baskaran I, Ganesan LT y Chandrasekar PH. 2004. "A comparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:386-389.
- Natesan SK, Chandrasekar PH, Alangaden GJ y Manavathu EK. 2008. "Fluvastatin potentiates the activity of caspofungin against *Aspergillus fumigatus* in vitro". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60:369-373.
- Pappalardo MCSM, Szeszs MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU, Baez AA y Melhem MSC. 2009. "Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64:146-151.
- Sionov E, Mendlovic S y Segal E. 2006. "Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis". *Journal of Infection* 53:131-139.

- Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S y Majoros L. 2009. "In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64:283-288.
- Tabosa Do Egito EST, Appel M, Fessi H, Barratt G, Puisieux F y Devissaguet JP. 1996. "In-vitro and in-vivo evaluation of a new amphotericin B emulsion-based delivery system". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 38:485-497.
- Takemoto K, Yamamoto Y y Ueda Y. 2006. "Evaluation of Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Ambisome against *Candida albicans*". *Microbiology and Immunology* 50:579-586.
- Traboulsi RS, Mukherjee PK y Ghannoum MA. 2008. "In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients". *International Journal of Antimicrobial Agents* 31:272-276.
- Vitale RG, Meis JFGM, Mouton JW y Verweij PE. 2003. "Evaluation of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B and nystatin against 30 zygomycetes using two different media". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:65-70.
- Yu BG, Okano T, Kataoka K and Kwon G. 1998. "Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B". *Journal of Controlled Release* 53:131-136.

ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS MÚLTIPLES

ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS MÚLTIPLES.

1. INTRODUCCIÓN.

Uno de los factores más importantes en el desarrollo de los estudios de dosis múltiples consiste en establecer las dosis del principio activo a administrar a los pacientes. En el caso de las micosis sistémicas, la anfotericina B es el tratamiento de elección. Este antifúngico actúa uniéndose a los esteroides de la membrana bicapa lipídica de la célula formando poros y causando la liberación de los constituyentes celulares (Yu, B.G. y col., 1998). Estos mismos autores indican que el principio activo presenta una actividad selectiva frente a las células fúngicas por su selectividad por el ergosterol (el esteroide mayoritario de las células fúngicas) frente al colesterol.

En cuanto a las dosis administradas de anfotericina B dependen de la formulación empleada. En el caso de tratamientos con formulaciones lipídicas de anfotericina B como la formulación comercial AmBisome[®], su baja toxicidad permite la administración de dosis elevadas de anfotericina B de 5 mg/kg/día. Incluso en algunos trabajos estudian la administración de dosis aun mayores (15 mg/kg) que llegan a ser bien toleradas por los pacientes como indican Adler-Moore, J.P. y col., 2004. Sin embargo, en el caso de la formulación comercial Fungizona[®], constituida por anfotericina B y desoxicolato de sodio, su elevada toxicidad sólo permite la administración de dosis máximas de 1 mg/kg/día.

Autores como Clark, J.M. y col., 1991, determinan que la toxicidad aguda, expresada como dosis letal 50 o LD₅₀, de la formulación comercial Fungizona[®] es de 3 mg/kg. La administración de dosis de 2-4 mg/kg originan la muerte de los roedores a las 24-48 horas. Además, Torrado, J.J. y col., 2008, observan que la utilidad de la anfotericina B está limitada por la severa nefrotoxicidad, que puede desembocar en fallo renal. Estos autores especifican que la administración de Fungizona[®] daba lugar a signos de desórdenes renales

severos en el 50% de los animales en algunos estudios. No obstante, Yu, B.G. y col., 1998, concluyen en su trabajo que los vectores basados en lípidos disminuyen la toxicidad de la anfotericina B manteniendo la actividad antifúngica aunque se observa una disminución de los niveles de anfotericina B en riñones. Otras líneas de investigación incluyen propuestas de vectorización como las emulsiones oleoacuosas o sistemas detergentes en forma micelar.

Debido a la importancia de las infecciones fúngicas en el ámbito hospitalario, donde los pacientes se encuentran en muchas ocasiones inmunosuprimidos, los ensayos de dosis múltiple se realizan en animales tanto inmunocompetentes (Adler-Moore, J.P. y col., 2004, Lincopan, N. y col., 2003 y MacCallum, D.M. y Odds, F.C., 2004) como inmunosuprimidos (Adler-Moore, J.P. y col., 2004, Andes, D. y col., 2006, Espuelas, M.S. y col., 2003 y Walsh, T.J. y col., 1998).

En los ensayos multidosis se estudia, además, mediante la determinación de distintos parámetros plasmáticos, la toxicidad de los tratamientos en órganos fundamentales del paciente. De este modo, se analizan distintos parámetros de funcionalidad renal mediante el estudio de la creatinina (Benson, J.M. y Nahata, M.C., 1989, Khan, M.A. y Owais, M., 2006, y Walsh, T. y col., 1998) y el nitrógeno ureico (Khan, M.A. y Owais, M., 2006, Larabi, M. y col., 2004 y Olson, J.A. y col. 2008).

Los tratamientos de dosis múltiples permiten conocer la eficacia del tratamiento frente al agente patógeno, *Candida albicans*, en forma de disminución en la escala logarítmica de la colonización de los órganos diana donde se encontrará mayoritariamente el agente patógeno infección. Entre estos órganos, se encuentran los riñones (Adler-Moore, J.P. y col., 2004, y Smith, P.J. y col., 2007), hígado (Andes, D. y col., 2006, Espuelas, M.S. y col., 2003 y Gondal, J.A. y col., 1989), bazo (Lincopan, N. y col., 2003 y Smith, P.J. y col., 2007), pulmón (Andes, D. y col., 2006), sangre (Gondal, J.A. y col., 1989) y cerebro (MacCallum, D.M. y Odds, F.C., 2004).

En cuanto a la determinación de la colonización de los órganos diana, Adler-Moore, J.P. y col., 2004, realizan estudios en ratones tanto inmunocompetentes como inmunosuprimidos, administrando dosis elevadas de anfotericina B (20 mg/kg/día) tres veces por semana, durante cinco semanas consecutivas. Los ratones se dividieron al inicio del tratamiento en grupos de cinco animales y, aquellos que sobrevivieron, fueron sacrificados los días 9, 24, 38 y 65 (un mes después de recibir el último tratamiento) respectivamente con el fin de conocer los niveles de *Candida albicans* presentes en los riñones. En estos ensayos se obtuvieron valores de infección fúngica en los riñones a las cuarenta y ocho horas post-infección de 5,25 log cfu/g (4,66-6,68) en ratones inmunocompetentes y, en el caso de los inmunosuprimidos, de 5,68 log cfu/g (5,25-6,04). La administración de dosis elevadas de anfotericina B a animales inmunocompetentes en días alternos permite la reducción de manera significativa de la infección fúngica, expresada en escala logarítmica, al final de la primera semana de tratamiento con respecto al grupo control. La eficacia obtenida al cabo de las tres semanas y al final del ensayo mejoró presentando, tras cinco semanas de tratamiento, únicamente un animal 1,2 log cfu/g en los riñones. Transcurridas cuatro semanas desde la administración de la última dosis, únicamente un ratón presentaba colonización renal, alcanzando un valor de 1,31 log cfu/g.

Andes, D. y col., 2006, realizan los estudios de colonización de los riñones, hígado, bazo y pulmones en ratones neutropénicos. En este estudio, se administran dosis diarias crecientes de anfotericina B, alcanzando dosis totales entre 0,08 y 20 mg/kg/día, y entre 0,312 y 80 mg/kg/día en el caso de administrar formulaciones liposómicas y complejos lipídicos de anfotericina B. Al comienzo de la terapia, los niveles de colonización a nivel renal eran de $10^{3,4} \pm 10^{0,30}$ cfu/riñones a $10^{3,5} \pm 10^{0,24}$ cfu/riñones. Transcurridas 48 horas de la inoculación del agente patógeno, los niveles de *C. albicans* habían aumentado en los ratones control de $10^{3,7} \pm 10^{0,32}$ cfu/riñones a $10^{4,2} \pm 10^{0,27}$ cfu/riñones. La relación dosis respuesta de los tratamientos tanto para las distintas cepas de *Candida albicans* como para los distintos órganos en los que se ha estudiado la infección por *Candida albicans* K1 muestra la disminución en, al menos, una unidad logarítmica en todos los tratamientos. No obstante, las diferencias entre

la anfotericina B y la anfotericina B en complejos lipídicos y liposomas son significativas en casi todos los puntos finales del estudio y de las cepas.

Gondal, J.A. y col., 1989, realizan los estudios de eficacia de dosis múltiple de una formulación de anfotericina B en liposomas comparándola con la formulación comercial Fungizona®. Se emplean dosis de 1,0 y 1,5 mg/kg de Fungizona® o de 5,0; 6,5 y 8,5 mg/kg de anfotericina B administrada en forma de liposomas, administrándose los días 3, 6 y 9 post-infección. El estudio tenía una duración de 42 días, analizándose diariamente la supervivencia. Los valores de supervivencia media fueron de 33 días tras el tratamiento de dosis de 1 mg/kg de Fungizona®, dosis con la que el 37,5% de los animales alcanza una supervivencia de 42 días, mientras que, tras la administración de 1,5 mg/kg, se obtiene una supervivencia media de 30 días. Con esta dosis mayor, sólo el 25% de los animales alcanza los 42 días de supervivencia. Sin embargo, tras la administración de 5,0 y 6,5 mg/kg de anfotericina B formulada como liposomas, se lograron valores de supervivencia de 42 días en ambas dosis en unas proporciones iguales o superiores al 92%. En aquellos animales tratados con 8,5 mg/kg de anfotericina B en forma liposómica se alcanza el 100% de supervivencia. Una vez transcurrida la duración del ensayo, se procedió a realizar el estudio de la colonización en sangre, hígado y bazo. En ninguno de los casos se encontraron colonias viables de *C. albicans*.

Otros autores como Lincopan, N. y col., 2003, desarrollan un estudio de 35 días de duración en el que se analizaba la supervivencia tras la administración intravenosa de dosis de anfotericina B de 0,2 mg/kg/día durante 4 días consecutivos. Se determinaron las cfu/g de tejido en riñones y bazo tras la infección por *Candida albicans* y su posterior tratamiento. La administración endovenosa de 0,2 mg/kg/día de anfotericina B administrada junto con el desoxicolato de sodio durante 4 días consecutivos obtuvo un porcentaje de supervivencia del 20% al final del ensayo. La administración de la anfotericina B y desoxicolato de sodio permitió además la reducción de las unidades formadoras de colonias tanto en los riñones como en el bazo.

En estos estudios es importante conocer también la posible alteración renal de los pacientes tras el tratamiento de candidiasis con anfotericina B mediante el análisis de los valores de creatinina sérica y del nitrógeno ureico y la determinación de las anomalías morfológicas.

A pesar de la elevada nefrotoxicidad de la anfotericina B, autores como Benson, J.M. y Nahata, M.C., 1989, además, de observar una correlación inversa entre la edad del paciente y el aclaramiento del principio activo, no encontraron en sus experimentos la relación entre los niveles de creatinina sérica en los pacientes y las concentraciones séricas máximas de anfotericina B. Dichos autores determinan que los resultados obtenidos pueden ser debidos bien a la administración de dosis elevadas o a la inadecuada pauta posológica a la que se vieron sometidos los pacientes.

Boswell, G.W. y col., 1998, realizaron estudios de los valores de nitrógeno ureico sanguíneo, parámetros hepáticos y hematológicos en ratas no infectadas tras la administración de dosis de 1; 3; 9 y 20 mg/kg/día de AmBisome[®] durante 30 días a través de la vena de la cola. Tras la administración diaria de dosis elevadas de AmBisome[®], concretamente de 9 y 20 mg/kg/día, se elevaron las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre por encima de los parámetros normales, triplicándose y cuadruplicándose respectivamente los valores respecto a los valores de laboratorio considerados normales.

Fukui, H. y col., 2003, determinan los valores de nitrógeno ureico en sangre en ratas no infectadas en un ensayo de toxicidad de dosis múltiple de una formulación nanoesferas lipídicas de anfotericina B. Ésta se comparó con la toxicidad causada tras la administración de Fungizona[®]. Ambas formulaciones fueron administradas en dosis de 0,5 y 2 mg/kg/día durante catorce días consecutivos por vía intravenosa. Los valores de nitrógeno ureico se incrementaron de manera significativa tras la administración de dosis múltiples elevadas de Fungizona[®] y de las nanoesferas lipídicas. La administración de nanoesferas lipídicas de anfotericina B presentó un efecto menos dañino a nivel renal que la formulación comercial Fungizona[®]. Así, tras la administración

de dosis de 2 mg/kg/día, los valores del nitrógeno ureico sanguíneo varían de 25 ± 3 mg/dl, alcanzado en los grupos control, a 49 ± 10 mg/dl en las nanoesferas lipídicas de anfotericina B mientras que los valores de nitrógeno ureico del grupo tratado con Fungizona[®] eran superiores tras la administración de la misma dosis (69 ± 14 mg/dl). Sin embargo, la administración de dosis de 0,5 mg/kg de anfotericina como nanoesferas lipídicas no originaba cambios significativos en los valores de nitrógeno ureico, alcanzándose niveles similares en el área bajo la curva (AUC_{2-24h}) a los obtenidos con 2 mg/kg de Fungizona[®]. Esto sugiere que una terapia con dosis bajas de anfotericina B como nanoesferas lipídicas sería capaz de mantener la eficacia disminuyendo los efectos secundarios.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- *Materiales.*

2.1.1.- Productos y reactivos.

La anfotericina B (AMB) y la especialidad farmacéutica Fungizona[®] fueron suministradas por Bristol Myers Squibb (Barcelona, España). El desoxicolato de sodio (DCH) fue adquirido a Fluka Chemie A. G. (Buchs, Suiza). La especialidad farmacéutica AmBisome[®] se encuentra comercializada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).

El agua purificada estéril fue obtenida por un sistema Milli-Q (Millipore), (New Hampshire, Estados Unidos) mientras que el Suero Fisiológico Vitulia[®] (cloruro sódico al 0,9%) se encuentra comercializado por Laboratorios Ern, S. A. (Barcelona, España).

2.1.2.- Material biológico.

Animales:

El ensayo se lleva a cabo en ratones machos ICR (25-30 g) tras un periodo de aclimatación de 7 días, agrupados en grupos de siete animales cada uno y mantenidos durante el tiempo de experimentación en jaulas de plástico, siguiendo ciclos de luz - oscuridad de 12 horas cada uno, con agua y alimento *ad libitum* en el laboratorio de experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva 86/609/EU de la Legislación de la Unión Europea.

Inóculo:

El desarrollo de los estudios de concentración mínima inhibitoria (MIC), de concentración mínima fungicida (MFC) y de eficacia tras el tratamiento con

dosis múltiples a roedores se lleva a cabo empleando la cepa SC5314 de *Candida albicans*.

La suspensión de la cepa SC5314 de *Candida albicans* se obtiene tras su siembra en una placa de agar de extracto de levadura y dextrosa (Yeast Extract-Dextrose o YED). A continuación, se procede al lavado de la cepa con tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline o PBS), diluyéndose a continuación con el mismo tampón hasta obtener una concentración de $1 \cdot 10^6$ unidades formadoras de colonias/ mililitro (cfu/ml) para el estudio de los parámetros microbiológicos y de $2 \cdot 10^6$ cfu/ml a la determinación de la eficacia de los tratamientos de dosis múltiples de los roedores.

2.1. Métodos.

2.2.1.- Método para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de la anfotericina B para *C. albicans* SC5314 fue determinada mediante una técnica de microdilución M27-A, recomendada por el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). El rango de concentraciones de anfotericina B estudiado fue entre 0,10 y 1,0 mg/l.

Su determinación fue realizada por triplicado con ± 1 dilución seriada del antifúngico. Las MICs obtenidas para *C. albicans* fueron determinadas utilizando un inóculo de $1 \cdot 10^6$ cfu/ml, procediéndose a realizar diluciones hasta valores de $1 \cdot 10^3$ cfu/ml.

2.2.2.- Método para la determinación de la concentración mínima fungicida (MFC).

El MFC calculado es la concentración mínima fungicida para *C. albicans* y corresponde a la menor concentración de anfotericina B que disminuye al 99,9% (equivalentes a menos de 5 cfu). Este parámetro fue determinado mediante la siembra de 100 µl de cada uno de los pocillos utilizados en la determinación del MIC realizándose la siembra en placas de agar Sabouraud-dextrosa e incubadas a 35°C durante 72 horas.

2.2.3. Modelo de infección en ratones.

La infección se realiza mediante la administración de 0,5 ml de la suspensión de la cepa SC5314 de *C. albicans* a través de la vena lateral de la cola de los ratones 72 horas antes de administrar el tratamiento.

Las eficacias de los tratamientos se estudian durante 27 días, tiempo establecido desde la primera administración de cada uno de los tratamientos mediante el estudio de la supervivencia tanto diaria como al final del ensayo. Además, se calculan los tiempos de supervivencia media (Mean Survival Time o MST).

Debido a la gran afinidad de *C. albicans* por el cerebro y los riñones, y a la importancia de su infección en la supervivencia de los animales, se realizan estudios de colonización de *C. albicans* tanto a nivel cerebral como a nivel renal. De este modo, se conocerá el aclaramiento del patógeno y la eficacia de los tratamientos administrados para su erradicación mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (cfu).

El número de unidades formadoras de colonias se conoce tras la siembra de los homogeneizados de riñones y cerebro de los ratones. Para ello, los ratones son sacrificados mediante inhalación de cloroformo, extrayendo

asépticamente tanto los riñones como el cerebro. La homogeneización de los órganos fue llevada a cabo en 5 ml de solución tampón fosfato. Los órganos homogeneizados fueron sembrados en agar levadura-dextrosa-cloranfenicol y sembrados durante 24-48 horas a 37°C.

Sin embargo, a nivel renal, es necesario considerar la posible nefrotoxicidad que puede afectar a su funcionalidad. Por esta razón, se analizaron los valores de creatinina y nitrógeno ureico en plasma.

2.2.4.- Administración del tratamiento.

El tratamiento comienza transcurridas 48 horas tras la inoculación de *C. albicans* en los ratones. Se procede a la administración semanal de 0,2 ml de cada formulación a través de la vena lateral de la cola a cada uno de los grupos de roedores que reciben cuatro dosis de tratamiento.

Este estudio se realiza con once grupos de 4 ó 7 ratones cada uno.

Se emplean dos grupos control de 4 ratones que no reciben tratamiento con anfotericina B a los que solo se les administran 0,2 ml de suero salino 0,9%, uno de ellos infectados con *Candida albicans* y otro sin infectar.

Los grupos de ratones tratados con anfotericina B (4 ratones) a partir de las formulaciones de referencia (AmBisome[®] o Fungizona[®]) reciben 0,2 ml de cada una de las formulaciones.

Los grupos de ratones tratados con anfotericina B (7 ratones) a partir de cada una de las formulaciones a estudiar reciben 0,2 ml de cada una de ellas.

En la Tabla 1 se muestran los tratamientos y dosis recibidas de los grupos control y de los grupos que reciben las formulaciones comerciales de referencia.

En la Tabla 2 se indican los tratamientos y dosis recibidas de las nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B.

FORMULACIÓN	DOSIS SEMANAL ADMINISTRADA (mg/kg)
AmBisome®	5
Fungizona®	1
Grupo Control infectado por <i>Candida albicans</i> no tratado con anfotericina B	---
Grupo Control no infectados por <i>Candida albicans</i> y no tratado con anfotericina B	---

Tabla 1.- Relación de las formulaciones comerciales de referencia y de los grupos control así como de las dosis administradas en cada grupo.

FORMULACIÓN	DOSIS SEMANAL ADMINISTRADA (mg/kg)
AMB:DCH 1:0	1
AMB:DCH 1:0,8	1
AMB:DCH 1:0,8	3
AMB:DCH 1:0,8	5
AMB:DCH 1:1,5	1
AMB:DCH 1:1,5	3
AMB:DCH 1:1,5	5

Tabla 2.- Relación de las formulaciones objeto de estudio y de las dosis administradas en cada grupo. AMB: DCH corresponde a la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio incluida en cada formulación.

3. RESULTADOS.

3.1.- Estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MFC).

Los valores obtenidos de concentración mínima inhibitoria (MIC) y de concentración mínima fungicida (MFC) de la anfotericina B se encuentran recogidos en la Tabla 3. En ella, se indica, además, la proporción de desoxicolato de sodio respecto a la anfotericina B.

AMB:DCH	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)
1:0	1,0	3,0
1:0,4	1,0	3,0
1:0,8	1,0	3,0
1:1,5	1,0	3,0
1:2	0,8	2,0-3,0
1:3	0,8	1,2
1:4	0,8	1,0
1:8	0,8	0,8

Tabla 3.- Resultados obtenidos en los estudios de MIC y MFC, expresados en µg/ml, de anfotericina B respecto a las distintas proporciones de desoxicolato de sodio incluidas en las formulaciones.

La anfotericina B, en las nuevas formulaciones, presenta una concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a *C. albicans* de 0,8 a 1 µg/ml. Autores como Klepser, M.E. y col., 1997, y Fan Harvard, P. y col., 1991, han obtenido resultados similares en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para distintas cepas de este patógeno que oscilan entre 0,5 y 1 µg/ml.

Cantón, E. y col., 2003, Cantón, E. y col., 2004 y Kamysz E. y col., 2011 realizan diversos estudios de CMI y de MFC de distintas especies de cándidas y recogen resultados de MIC entre 0,12 y 2 µg/ml y de MFC entre 0,25 y 8 µg/ml. Los valores de MFC en la bibliografía consultada son siempre iguales o mayores que sus valores de MIC.

En el presente trabajo estudio se evalúa como influye la proporción del desoxicolato de sodio sobre los valores de MIC y MFC. La formulación sin desoxicolato sódico (AMB:DCH 1:0), presenta valores de MFC 3 veces superiores a los del MIC, relación que se encuentra dentro de los valores comentados previamente por distintos autores como Cantón, E. y col., 2003 y Kamysz E. y col., 2011. Al administrar proporciones de desoxicolato sódico frente a la anfotericina B de 0,4; 0,8 y 1,5; (AMB:DCH 1:0,4; AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5) se obtienen también valores de MFC 3 veces superiores al MIC.

Cuando las proporciones de desoxicolato de sodio son iguales o superiores al doble de las proporciones de anfotericina B disminuyen tanto las concentraciones MIC como las MFC. La formulación AMB:DCH 1:2; permite obtener niveles menores de MIC y MFC, alcanzando valores de 0,8 y 2,0 µg/ml respectivamente. Las formulaciones con proporciones mayores de tensioactivo (AMB:DCH 1:3; AMB:DCH 1:4 y AMB:DCH 1:8) presentan una disminución de los valores de MFC, con relaciones de MFC/MIC de 1,5; 1,25 y 1,0. El descenso en la relación entre MIC/MFC, puede estar relacionado con el mayor efecto promotor del desoxicolato de sodio en la permeabilidad de las paredes celulares y membranas citoplasmáticas a medida que aumenta la proporción de este tensioactivo en las formulaciones (Panáček, A. y col., 2009). De hecho las concentraciones mínimas fungicidas disminuyen progresivamente a medida que aumenta la proporción de desoxicolato de sodio en las formulaciones de poliagregados hasta llegar a igualar la CMI (0,8 µg/ml) en el caso de la formulación AMB:DCH 1:8.

3.2.- Estudio de la morfología y funcionalidad renal.

Las alteraciones tanto en la morfología como en la funcionalidad renal pueden ser debidas como se ha indicado anteriormente tanto a la afección de los riñones por la afinidad que presenta *C. albicans* por este órgano así como por la elevada nefrotoxicidad que presenta la anfotericina B.

La funcionalidad renal se encuentra reflejada en los niveles plasmáticos de creatinina y nitrógeno ureico. Valores elevados o disminuidos de estos parámetros indican una alteración renal. Las tablas 4, 5 y 6 muestran los valores de creatinina y nitrógeno ureico de las formulaciones de referencia (AmBisome® y Fungizona®) y de las formulaciones objeto de estudio.

FORMULACIÓN	CREATININA PLASMÁTICA	NITRÓGENO URÉICO
	± S.D. (mg/dl)	± S.D. (mg/dl)
4*AmBisome® (5 mg/kg)	0,20 ± 0,00	44,17 ± 7,77*
4*Fungizona® (1 mg/kg)	0,35 ± 0,06*	28,00 ± 2,55
Control (con infección)	---	---
Control (sin infección)	0,23 ± 0,06	25,97 ± 2,55

Tabla 4.- Relación de los valores de toxicidad renal obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones de referencia. S.D. corresponde a la desviación estándar.

***Probabilidad “t student” significativa ($p < 0,05$) frente a animales control (sin infección).**

FORMULACIÓN	CREATININA PLASMÁTICA ± S. D. (mg/dl)	NITRÓGENO URÉICO ± S. D.(mg/dl)
4*AMB:DCH 1:0 (1 mg/kg)	0,43 ± 0,23*	87,40 ± 46,43*
4*AMB:DCH 1:0,8 (1 mg/kg)	0,40 ± 0,10*	76,62 ± 17,35*
4*AMB:DCH 1:1,5 (1 mg/kg)	0,40 ± 0,10*	80,47 ± 7,18*

Tabla 5.- Relación de los valores de toxicidad renal obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones objeto de estudio. S. D. corresponde a la desviación estándar.

*Probabilidad “t student” significativa ($p < 0,05$) frente a animales control (sin infección).

FORMULACIÓN	CREATININA PLASMÁTICA ± S. D. (mg/dl)	NITRÓGENO URÉICO ± S. D.(mg/dl)
4*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	0,26 ± 0,05	43,80 ± 14,10*
4*AMB:DCH 1:0,8 (5 mg/kg)	0,33 ± 0,06	31,57 ± 1,93*
4*AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg)	0,32 ± 0,11	28,74 ± 3,72
4*AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg)	0,32 ± 0,10	30,14 ± 8,58

Tabla 6.- Relación de los valores de toxicidad renal obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones objeto de estudio. S. D. corresponde a la desviación estándar.

*Probabilidad “t student” significativa ($p < 0,05$) frente a animales control (sin infección).

La afección renal es analizada a través de la morfología y el tamaño de los riñones. En este estudio, los riñones presentaban, en general, un aspecto y tamaño homogéneo tras la administración de dosis múltiples. No obstante, la administración de dosis de 1 mg/kg de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:0; 1:0,8 y 1:1,5 presentaban, en varios animales atrofia unilateral en los riñones. El elevado número de animales con dichas alteraciones se atribuye a que la administración de dosis bajas de anfotericina B (1 mg/kg) no es suficiente para erradicar la infección. Sin embargo, aunque en menor medida, también se observan casos de atrofia renal unilateral tras la administración de dosis de 3 mg/kg. Este hecho confirma la importancia de la administración de una dosis inicial elevada en el tratamiento.

Como se ha comentado previamente, la alteración de la funcionalidad renal, medida a través de la creatinina y del nitrógeno ureico, puede ser originada tanto por la infección por *Candida albicans*, que presenta una mayor afinidad por el tejido renal y cerebral, como por los tratamientos con anfotericina B, agente antifúngico que presenta una elevada nefrotoxicidad.

En el estudio de la alteración en la funcionalidad renal de las formulaciones, se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de creatinina tras el tratamiento con cuatro dosis de 1 mg/kg de Fungizona® en comparación con los animales control. Cuando se realiza el estudio con formulaciones que presentan proporciones crecientes de desoxicolato (1:0; 1:0,8 y 1:1,5) con la misma dosis de anfotericina B (1 mg/kg), se produce un aumento también significativo ($p < 0,05$) en los valores de creatinina como se muestra en la Tabla 5.

Sin embargo, al comparar los resultados de nitrógeno ureico se observa que mientras que la formulación comercial Fungizona® no presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) frente al control ($28,00 \pm 2,55$ mg/dl), la formulación AmBisome® presenta un aumento significativo ($p < 0,05$) en sus valores de nitrógeno ureico. Todas las nuevas formulaciones de poliagregados a dosis de 1 mg/kg producen incluso mayores valores de este parámetro (Tabla 5). Lo que vuelve a confirmar que esta dosis es insuficiente para el tratamiento con las nuevas formulaciones estudiadas.

Las formulaciones constituidas por anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8 y 1:1,5 a dosis más elevadas (3 y 5 mg/kg), presentan un descenso en sus valores de creatinina cuando se compara con las mismas formulaciones a dosis menores (ver Tablas 5 y 6). De hecho, sus valores de creatinina no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) a los observados en el grupo control. Los datos de nitrógeno ureico para estas mismas dosis de 3 y 5 mg/kg con las nuevas formulaciones indican que cuando se emplea la formulación con la mayor proporción de desoxicolato de sodio (AMB:DCH 1:1,5) no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de

nitrógeno ureico que los obtenidos en el grupo control. Mientras que cuando la formulación tienen una menor proporción de desoxicolato de sodio (AMB:DCH 1:0,8) los valores de nitrógeno ureico se encuentran ligeramente elevados (ver Tabla 6).

Estos resultados de los parámetros bioquímicos renales permiten considerar que la formulación de poliagregados AMB:DCH 1:1,5 presenta una mayor eficacia erradicadora de la candidiasis renal a dosis de 3 y 5 mg/kg que la formulación AMB:DCH 1:0,8. Sin embargo, esta formulación AMB:DCH 1:0,8 cuando se administra a dosis de 3 mg/kg es la que presenta los menores valores de creatinina sérica y valores de nitrógeno ureico muy similares a los observados tras la administración de la formulación comercial AmBisome®.

3.3.- Estudio de supervivencia de los ratones infectados por C.albicans tras la administración de las formulaciones.

Con los datos de los animales que han fallecido en los diferentes días del experimento, se realiza el estudio de supervivencia tanto diaria como final para los distintos tratamientos, ya sean de formulaciones de referencia comerciales o las formulaciones objeto de estudio. La muerte de los animales que se produce en un 100% en el grupo control de animales infectados y no tratados durante los 5 días siguientes a la infección.

La Figura 1 muestra la supervivencia diaria de ratones tratados con las distintas formulaciones de anfotericina B para el tratamiento de la candidiasis sistémica.

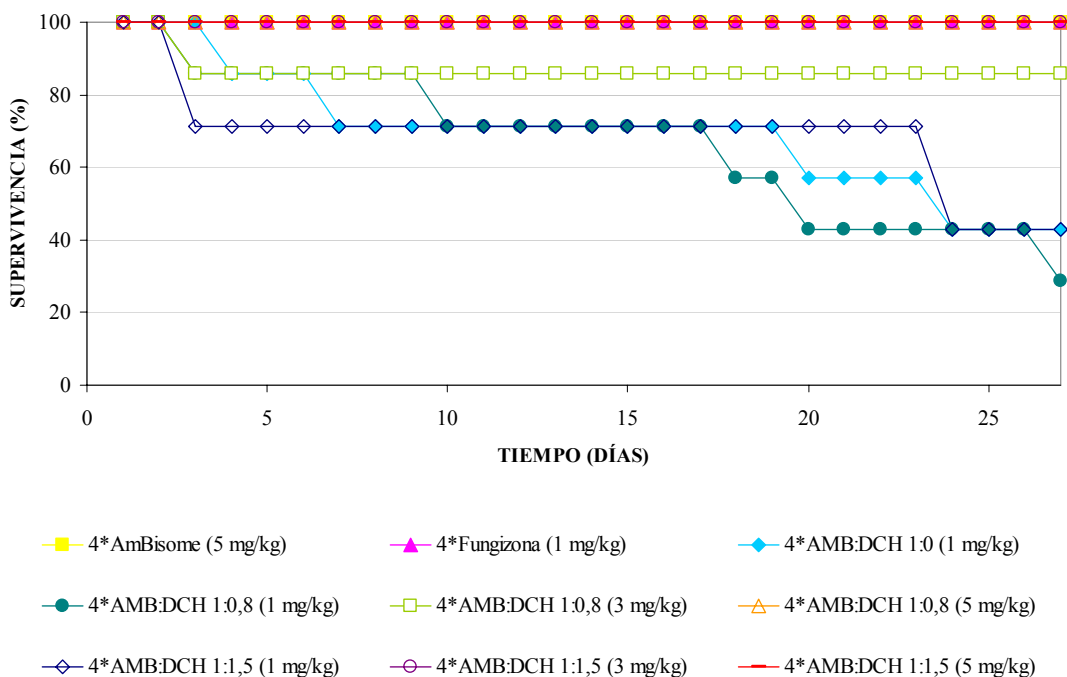


Figura 1.- Supervivencia diaria expresada en porcentaje. AMB:DCH representa la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio en cada una de las formulaciones objeto de estudio. Se indica además el número de dosis que reciben en los distintos tratamientos.

La tasa de supervivencia final obtenida en las formulaciones de referencia se muestra en la Tabla 7 mientras que la Tabla 8 refleja la tasa de supervivencia final de las formulaciones objeto de estudio.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE SUPERVIVIENTES	TASA DE SUPERVIVENCIA (%)
Control (con infección)	0/4	0
4*AmBisome [®] (5 mg/kg)	4/4	100
4*Fungizona [®] (1 mg/kg)	4/4	100

Tabla 7.- Valores de supervivencia en valores absolutos y en porcentaje obtenidos tras la administración de las formulaciones de referencia.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE SUPERVIVIENTES	TASA DE SUPERVIVENCIA (%)
4*AMB:DCH 1:0 (1 mg/kg)	3/7	42,86
4*AMB:DCH 1:0,8 (1 mg/kg)	2/7	28,57
4*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	6/7	85,71
4*AMB:DCH 1:0,8 (5 mg/kg)	7/7	100,00
4*AMB:DCH 1:1,5 (1 mg/kg)	3/7	42,86
4*AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg)	7/7	100,00
4*AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg)	7/7	100,00

Tabla 8.- Valores de supervivencia en valor absoluto y en porcentaje obtenidos en los grupos que han recibido las formulaciones objeto de estudio.

La tasa de supervivencia al final del ensayo tras la administración de las distintas formulaciones se muestra en la Figura 2.

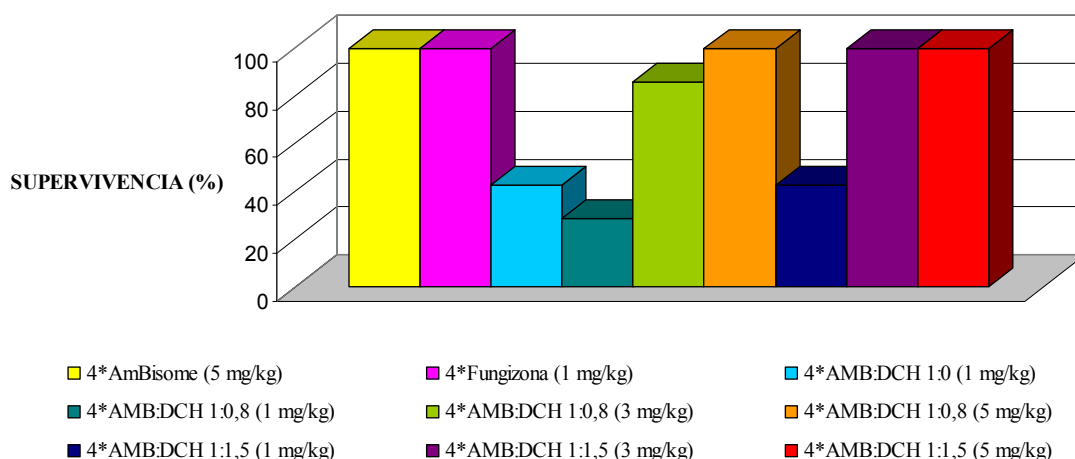


Figura 2.- Tasa de supervivencia de los ratones macho ICR al final del ensayo de dosis múltiple tras la administración de las formulaciones control y de las formulaciones objeto de estudio.

Las formulaciones comerciales de referencia, AmBisome® y Fungizona® presentan una tasa de supervivencia máxima. En el caso de la administración de las nuevas formulaciones a dosis de 5 mg/kg también se alcanza el 100% de supervivencia. Cuando la dosis administrada es de 3 mg/kg solamente se consigue el 100% de supervivencia cuando la formulación presenta la mayor proporción de desoxicolato de sodio (AMB:DCH 1:1,5).

Sin embargo, la administración de dosis de 3 mg/kg de la formulación AMB:DCH 1:0,8 presenta valores inferiores a la Fungizona[®] aunque tiene una tasa de supervivencia elevada (85,71%). Es importante indicar que, en este tratamiento el único ratón que murió lo hizo el segundo día del estudio, por lo que este fallecimiento se debe a que el tratamiento no fue capaz de disminuir la infección en este periodo inicial y en este animal, ya que los otros 6 ratones si sobreviven hasta el final del estudio.

La administración de dosis de 1 mg/kg de anfotericina B a partir de las nuevas formulaciones permite evaluar la influencia de la proporción de desoxicolato de sodio en la supervivencia de los animales a lo largo del tratamiento. Las formulaciones AMB:DCH 1:0 y AMB:DCH 1:0,8 se caracterizan porque se observa la muerte de varios ratones en los días intermedios del tratamiento (5-20 días). Sin embargo, cuando la proporción de desoxicolato de sodio es de 1,5 (AMB:DCH 1:1,5) tras el fallecimiento de los animales en los primeros días del estudio no vuelven a producirse nuevas muertes hasta el día 23 del mismo. Por lo que estas mayores proporciones de tensioactivo parece que permiten lograr una mayor eficacia antifúngica hasta que se produce una mayor reinfección en la última etapa del tratamiento. De hecho todas las nuevas formulaciones estudiadas a dosis de 1 mg/kg presentan una sobreinfección en la última etapa del tratamiento. Por lo tanto la anfotericina B en esta forma poliagregada requiere de dosis superiores a 1 mg/kg para el tratamiento de la candidiasis lo que concuerda con lo observado por otros autores (Espada, R. y col., 2008, y Lincopan, N. y col., 2003).

En las tablas 9 y 10 se recogen los valores de supervivencia media (Mean Survival Time o MST).

TRATAMIENTO	MST ± S. D. (días)	Nº RATONES SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
4*AmBisome [®] (5 mg/kg)	> 27,00	4/4
4*Fungizona [®] (1 mg/kg)	> 27,00	4/4

Tabla 9.- Tiempos medios de supervivencia (Mean Survival Time o MST) de las formulaciones de referencia obtenidos al finalizar el ensayo. S. D. corresponde a la desviación típica obtenida tras la administración de las distintas formulaciones.

TRATAMIENTO	MST ± S. D. (días)	Nº RATONES SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
4*AMB:DCH 1:0 (1 mg/kg)	18,86 ± 10,27	3/7
4*AMB:DCH 1:0,8 (1 mg/kg)	18,14 ± 9,71	2/7
4*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	23,43 ± 9,45	6/7
4*AMB:DCH 1:0,8 (5 mg/kg)	> 27,00	7/7
4*AMB:DCH 1:1,5 (1 mg/kg)	18,71 ± 11,56	3/7
4*AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg)	> 27,00	7/7
4*AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg)	> 27,00	7/7

Tabla 10.- Tiempos medios de supervivencia (Mean Survival Time o MST) de las formulaciones objeto de estudio obtenidos al finalizar el ensayo. S. D. corresponde a la desviación típica obtenida tras la administración de las distintas formulaciones.

Los tiempos medios de supervivencia máximos (27 días), obtenidos con las formulaciones de referencia (AmBisome[®] y Fungizona[®]), también se obtienen tras la administración de dosis de 5 mg/kg de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8 y 1:1,5. No obstante, igualmente se obtiene un tiempo medio de supervivencia de 27 días tras la administración de 3 mg/kg de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:1,5. Lo que nuevamente vuelve a confirmar que la incorporación de una mayor proporción de desoxicolato de sodio en la formulación permite obtener mejores resultados de supervivencia. En todas estas formulaciones, el 100% de los ratones ICR alcanzaron al final del estudio.

Es importante destacar que la administración de 3 mg/kg de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8 presenta un elevado tiempo medio de supervivencia, alcanzando niveles de $23,43 \pm 9,45$ días. Ya que el único animal que falleció, como ya se ha comentado, murió el día 2 del estudio sin que se lograsen reducir sus niveles de infección a tiempo.

La administración de dosis múltiples de 1 mg/kg de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:0, 1:0,8 y 1:1,5 alcanzó unos tiempos de supervivencia media de $18,86 \pm 10,27$, $18,14 \pm 9,71$ y $18,71 \pm 11,56$ días respectivamente. Aunque, como se puede observar en la figura 1, y como ya se ha indicado, la diferencia entre estas formulaciones estriba en los fallecimientos de animales en los días intermedios del estudio, cuando las formulaciones no contienen desoxicolato de sodio o lo tienen en una proporción del 0,8.

De este estudio se concluye que los tratamientos con estas nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B requieren la administración de dosis elevadas de anfotericina B (3 ó 5 mg/kg) y un tratamiento de choque de una formulación que sea eficaz en la erradicación de la infección en los periodos iniciales de la misma como es la formulación AMB:DCH 1:1,5.

Si bien la administración de dosis elevadas de anfotericina B liposómica realizada por Gondal, J.A. y col., 1989, permite alcanzar tasas elevadas de supervivencia tras la administración de dosis múltiples elevadas (5-8,5 mg/kg días 3, 6 y 9 post infección). En nuestro estudio, la administración de dosis inferiores de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio permiten obtener mejores resultados consiguiendo con la administración de 3 y 5 mg/kg/semana de anfotericina B que se incrementen tanto la supervivencia como el tiempo medio de supervivencia.

3.4.- Estudio de colonización a nivel renal y cerebral por *Candida albicans*.

Tras la administración de dosis múltiples de los distintos tratamientos, se procedió al sacrificio de los animales y la posterior extracción tanto del cerebro como de los riñones. A continuación, se homogenizaron y se sembraron en placas de agar levadura-dextrosa-cloranfenicol con el fin de determinar los niveles de colonización por *C. albicans*.

Las formulaciones comerciales de referencia, AmBisome[®] y Fungizona[®], permitieron el aclaramiento total del agente patógeno a nivel cerebral.

El aclaramiento total de la candidiasis a nivel cerebral también se consiguió con las nuevas formulaciones (AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5) cuando se administraron cuatro dosis de 5 mg/kg/semana. Este hecho permite considerar que esta dosis de anfotericina B poliagregada con desoxicolato de sodio es adecuada para la eliminación de la infección cuando ésta alcanza el cerebro.

No obstante, la administración de dosis semanales de 3 mg/kg no obtuvo los mismos resultados y se observan diferencias en función de la proporción de desoxicolato de sodio en las formulaciones de poliagregados. Así, en la formulación AMB:DCH 1:0,8 el 40% de los ratones están infectados (2 infectados/5 analizados) con niveles de colonización cerebral de $2,471 \pm 0,494$ log cfu/g (valor medio de 2 animales infectados). Sin embargo, La formulación de mayor proporción de desoxicolato (AMB:DCH 1:1,5) produce un descenso de infección cerebral y solo se obtuvo un único ratón infectado con colonización cerebral, de los seis animales tratados, con un valor de 2,121 log cfu/g tras recibir cuatro dosis de 3 mg/kg de anfotericina B. Por lo tanto el empleo de una proporción mayor de desoxicolato de sodio en estas formulaciones mejora notablemente la eficacia en la erradicación de la candidiasis cerebral posiblemente debido a una mayor facilidad de su paso a través de membranas.

Finalmente, la administración de dosis bajas (1 mg/kg) de anfotericina B en formulaciones de desoxicolato de sodio en proporciones 1:0 y 1:0,8 no presentan colonización cerebral en los 3 y 2 animales que llegaron al final del estudio respectivamente. Sin embargo, los 3 animales que llegaron al final del estudio tras el tratamiento con la formulación AMB:DCH 1:1,5 (1 mg/kg) presentaban candidiasis a nivel cerebral, alcanzándose niveles de $3,007 \pm 1,282$ log cfu/g. Este resultado, es importante ya que indica que a esta dosis tan baja existe un riesgo de colonización cerebral que hace desaconsejable pautar tratamientos a estas dosis.

Esta misma dosis de 1 mg/kg de anfotericina B poliagregada con desoxicolato de sodio presenta altos niveles de colonización renal en todos los animales que llegaron al final del estudio como se puede observar en los resultados medios incluidos en la Tabla 11.

En cuanto a las formulaciones comerciales de referencia AmBisome[®] y Fungizona[®] presentan un aclaramiento casi total de la infección a nivel renal. En este estudio, únicamente un ratón tratado con Fungizona[®] (1 infectado/ 4 analizados) presenta *Candida albicans* a nivel renal, alcanzado niveles de 5.697 log cfu/g. Adler-Moore, J.P. y col., 2004, obtienen también niveles elevados de erradicación renal al administrar dosis altas de anfotericina B (20 mg/kg/día) a animales inmunocompetentes, encontrando que únicamente un animal presenta colonización en riñones al final del estudio.

Los niveles de colonización renal tras la administración de las dosis múltiples con nuestra pauta de tratamiento semanal se muestran en la Tabla 11.

TRATAMIENTO	Ratones con aclaramiento	
	renal total / ratones analizados	Log ₁₀ CFU/g ± S. D.
4*AmBisome® (5 mg/kg)	3/3	---
4*Fungizona® (1 mg/kg)	3/4	5,697
4*AMB:DCH 1:0 (1 mg/kg)	0/3	5,092 ± 2,079
4*AMB:DCH 1:0,8 (1 mg/kg)	0/2	6,483 ± 0,065
4*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg) ¹	1/5	5,622 ± 0,441
4*AMB:DCH 1:0,8 (5 mg/kg) ¹	1/5	4,524 ± 0,002
4*AMB:DCH 1:1,5 (1 mg/kg)	0/3	6,342 ± 0,394
4*AMB:DCH 1:1,5 (3 mg/kg) ¹	1/6	6,034 ± 0,127
4*AMB:DCH 1:1,5 (5 mg/kg) ²	3/7	4,560 ± 1,256

Tabla 11.- Colonización renal de ratones ICR machos infectados por *Candida albicans* tras el tratamiento en dosis múltiple con las formulaciones objeto de estudio, expresada en unidades logarítmicas. S. D. corresponde a la desviación estándar.

¹ indica que uno de los roedores ha presentado un aclaramiento total del patógeno a nivel renal.

² indica que tres roedores han presentado un aclaramiento total del patógeno a nivel renal.

Estos roedores no se han incluido en la media.

La administración de las nuevas formulaciones de poliagregados a dosis de 3 mg/kg/semana (AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1: 1,5) presentan elevados niveles de colonización renal. Cuando la dosis se aumenta a 5 mg/kg/semana se observa un descenso de 1,098 y 1,474 log cfu/g para las formulaciones AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1: 1,5 respectivamente, lo que demuestra que la dosis de 3 mg/kg/semana es insuficiente si no se administra inicialmente una dosis de choque que disminuya los altos niveles iniciales de infección renal. Es importante destacar que el 20% de los animales que reciben la formulación de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporción 1:0,8 alcanzan el aclaramiento total de la infección, aumentando este dato hasta el 42,86%, al incrementar la proporción de desoxicolato de sodio en la formulación (1:1,5) para la misma dosis de anfotericina B. Estos resultados superan los obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo investigador (Espada, R. y col., 2008) en los que se alcanzaban aclaramientos del 25%.

4.- DISCUSIÓN.

La administración de un sistema de dosis múltiple ha adquirido un elevado interés en los últimos años (Espada, R. y col., 2008, y Mehta, P. y col., 2005), disminuyendo la nefrotoxicidad al mejorar la funcionalidad renal entre un tratamiento y el siguiente. Este estudio tiene por objetivo evaluar la toxicidad y eficacia de tres dosis diferentes (1 mg/kg/semana, 3 mg/kg/semana, y 5 mg/kg/semana).

Las dosis de 1 mg/kg/semana presentan la mayor nefrotoxicidad al final del estudio. Estos valores de nefrotoxicidad son menores al emplear dosis elevadas (3 mg/kg y 5 mg/kg). Por otra parte, los animales que recibieron la dosis inferior de anfotericina B (1 mg/kg/semana) fueron los que presentaron mayor infección renal. De este modo, se puede concluir que la nefrotoxicidad en estos ratones se debe más a la infección que al tratamiento administrado. Los tiempos de supervivencia media tras la administración de esta dosis (1 mg/kg/semana) fueron inferiores a los 20 con tasas de supervivencia al final del ensayo inferiores al 50% resultados que se explican por la elevada colonización a nivel renal al final del estudio (ver Tabla 11).

La administración de dosis de 3 mg/kg/semana presenta valores de toxicidad y de eficacia dependientes de la proporción de desoxicolato sódico en las formulaciones. Al incrementar la proporción de desoxicolato de sodio en la formulación se produce la mejora de la eficacia de supervivencia (85,71 y 100% para las formulaciones AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 respectivamente) a la vez que se produce un ligero aumento no significativo ($p>0,05$) en la nefrotoxicidad reflejada por los niveles de creatinina (0,26 y 0,32 mg/dl para las formulaciones AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 respectivamente). Es importante destacar que el único animal que muere tras el tratamiento con la formulación AMB:DCH 1:0,8 lo hace al segundo días tras el tratamiento por lo que esta formulación requeriría de la administración inicial de una dosis de choque con mayor dosis de anfotericina B que disminuya la alta infección

inicial. Posiblemente, uno de los factores más relevantes de esta dosis consiste en la colonización a nivel cerebral de dos animales (2 infectados/5 analizados) al administrar proporciones de 1:0,8 ($2,471 \pm 0,494$ log cfu/g) y de un animal (1 infectado/6 analizados) al trabajar con la proporción 1:1,5 (2,121 log cfu/g). Este resultado indica nuevamente que estas dosis de 3 mg/kg/semana de las nuevas formulaciones requieren un tratamiento inicial con dosis mayores de anfotericina B como podría ser la dosis de 5 mg/kg ya que el estudio con dosis múltiple de 5 mg/kg/semana consiguió erradicar la infección cerebral en todos los animales analizados.

La administración de dosis de 5 mg/kg/semana de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporciones 1:0,8 y 1:1,5 presentan valores de creatinina (0,33 y 0,32 mg/dl respectivamente) que no difieren significativamente ($p > 0,05$) de los obtenidos en el grupo control. Además, los buenos resultados de eficacia de estas formulaciones administradas en dosis de 5 mg/kg/semana se reflejan en que no existe infección cerebral en ninguno de los animales estudiados y en un descenso de, al menos, una unidad logarítmica en la colonización renal al final del estudio en los animales infectados. Es de destacar que 3 de los 7 animales analizados presentaban un aclaramiento total en sus niveles de infección renal.

5.- BIBLIOGRAFÍA.

- Adler-Moore JP, Olson JA y Proffitt RT. 2004. "Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (AmBisome) effective in treating murine systemic candidiasis". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54:1096-1102.
- Andes D, Safdar N, Marchillo K y Conklin R. 2006. "Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of amphotericin B (AMB) and two lipid-associated AMB preparations, liposomal AMB and AMB lipid complex, in murine candidiasis models". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:674-684.
- Benson JM y Nahata MC. 1989. "Pharmacokinetics of amphotericin B in children". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33:1989-1993.
- Boswell GW, Bekersky I, Buell D, Hiles R y Walsh TJ. 1998. "Toxicological profile and pharmacokinetics of a unilamellar liposomal vesicle formulation of amphotericin B in rats". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:263-268.
- Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A y Espinel-Ingroff A. 2004. "Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:2477-2482.
- Clark JM, Whitney RR, Olsen SJ, George RJ, Swerdel MR, Kunselman L y Bonner DP. 1991. "Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35:615-621.

- Espada R, Valdespina S, Molero G, Dea MA, Ballesteros MP y Torrado JJ. 2008. "Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B". *International Journal of Antimicrobial Agents* 32:55-61.
- Espuelas MS, Legrand P, Campanero MA, Appel M, Chéron M, Gamazo C, Barratt G e Irache JM. 2003. "Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:419-427.
- Fan-Harvard P, Capano D, Smith SM, Mangia A y Eng RHK. 1991. "Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35:2302-2305.
- Fukui H, Koike T, Saheki A, Sonoke S, Tomii Y y Seki J. 2003. "Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS[®])". *International Journal of Pharmaceutics* 263:51-60.
- Gondal JA, Swartz RP y Rahman A. 1989. "Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33:1544-1548.
- Kamysz E, Simonetti O, Cirioni O, Arzeni D, Ganzetti G, Campanati A, Giacometti A, Gabrielli E, Silvestri C, Kamysz W, Offidani A and Barchiesi F. 2011 "*In vitro* activity of the pilopeptide PAL-Lys-Lys-NH₂, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida spp*". *Peptides* 32: 99-103.

- Khan MA y Owais M. 2006. "Toxicity, stability and pharmacokinetics of amphotericin B in immunomodulator tuftsin-bearing liposomes in a murine model". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58:125-132.
- Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH y Pfaller MA. 1997. "Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:1392-1395.
- Larabi M, Pages N, Pons F, Appel M, Gulik A, Schlatter J, Bouvet S y Barratt G. 2004. "Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:81-88.
- Lincopan N, Mamizuka EM y Carmona-Ribeiro AM. 2003. "In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:412-418.
- MacCallum DM y Odds FC. 2004. "Need for early antifungal treatment confirmed in experimental disseminated *Candida albicans* infection". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:4911-4914.
- Mehta P, Vinks A, Filipovich A, Vaughn G, Fearing D, Sper C y Davies S. 2005. "High-Dose weekly AmBisome antifungal prophylaxis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A pharmacokinetic study". *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 12: 235-240.
- Olson JA, Adler-Moore JP, Jensen GM, Schwartz J, Dignani MC y Proffitt RT. 2008. "Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:259-268.

- Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Pruček R, Soukupová J, Krystof V, Hamal P, Zboril R, Kvítek L. 2009. "Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp". *Biomaterials* 30:6333-6340.
- Smith PJ, Olson JA, Constable D, Schwartz J, Proffitt RT y Adler-Moore JA. 2007. "Effects of dosing regimen on accumulation, retention and prophylactic efficacy of liposomal amphotericin B". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59:941-951.
- Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F y Kuwahara S. 2000. "In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:57-62.
- Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP y Torrado S-Santiago. 2008. "Amphotericin B formulations and drug targeting". *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:2405-2425.
- Walsh TJ, Yeldandi V, McEvoy M, Gonzalez C, Chanock S, Freifeld A, Seibel NI, Whitcomb PO, Jarosinski P, Boswell G, Bekersky I, Alak, A, Buell D, Barret J y Wilson W. 1998. "Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:2391-2398.
- Yu BG, Okano T, Kataoka K y Kwon G. 1998. "Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B". *Journal of Controlled Release* 53:131-136.

ESTUDIOS DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ALTERNAS .

ESTUDIO DE EFICACIA Y TOXICIDAD EN DOSIS ALTERNAS.

1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años han aparecido distintos trabajos de investigación en los que se plantea la posibilidad de utilizar diferentes regímenes posológicos para la administración de anfotericina B. Así, se observa, que la administración de dosis elevadas de anfotericina B de forma intermitente durante cortos periodos de tiempo (6 días) puede ser tan segura y eficaz como tratamientos diarios administrados durante periodos más prolongados (hasta 14 días). Estos tratamientos alternativos tendrían la ventaja adicional del menor coste del tratamiento y la reducción en la exposición al antifúngico (Ellis, M., 2008 y Adler-Moore, J.P. y col., 2004).

Tomando como base estos estudios, se procedió a evaluar la seguridad y la eficacia que presenta la administración de las nuevas formulaciones en tratamientos que combinan distintas dosis y proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio. Para la selección de las dosis y formulaciones más adecuadas se realiza un estudio sobre los parámetros de seguridad que se determinan tras la administración de diferentes tratamientos con anfotericina B. Así, la anfotericina B, empleada en el tratamiento de las infecciones fúngicas invasivas, causa efectos adversos en distintos sistemas del organismo, principalmente a nivel renal (Torrado, J.J. y col., 2008), hepático (Espada, R. y col., 2008b) y hematológico (Espada, R. y col., 2008a).

La anfotericina B se caracteriza por formar canales en las membranas celulares al interactuar con los esteroides. En el caso de las membranas fúngicas, la capacidad de formación de estos canales por parte de la anfotericina B es mayor debido a la mayor afinidad de la anfotericina B por el ergosterol frente al colesterol (Huang, W. y col., 2002).

Huang, W. y col., 2002, en este mismo trabajo, concluyen que el estado de agregación del principio activo está condicionado por su concentración en el medio. De esta manera, la anfotericina B se encuentra en estado agregado cuando es administrada a dosis iguales o superiores a 10^{-6} molar (M) mientras que a dosis inferiores ($1 \cdot 10^{-7}$ - $2 \cdot 10^{-7}$ M) aparece en estado monomérico.

Este estudio permite comprobar que concentraciones de anfotericina B de $1 \cdot 10^{-7}$ M - $2 \cdot 10^{-7}$ M originan algunos poros en el complejo de rutenio presente en la membrana de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y el ergosterol. La aparición de poros en la membrana, en cuya composición se encuentra el colesterol, no ocurre hasta alcanzar concentraciones de anfotericina B de $1 \cdot 10^{-6}$ M. Sin embargo, estas concentraciones de anfotericina no ocasionan ningún daño a aquellas membranas donde existe únicamente dimiristoilfosfatidilcolina.

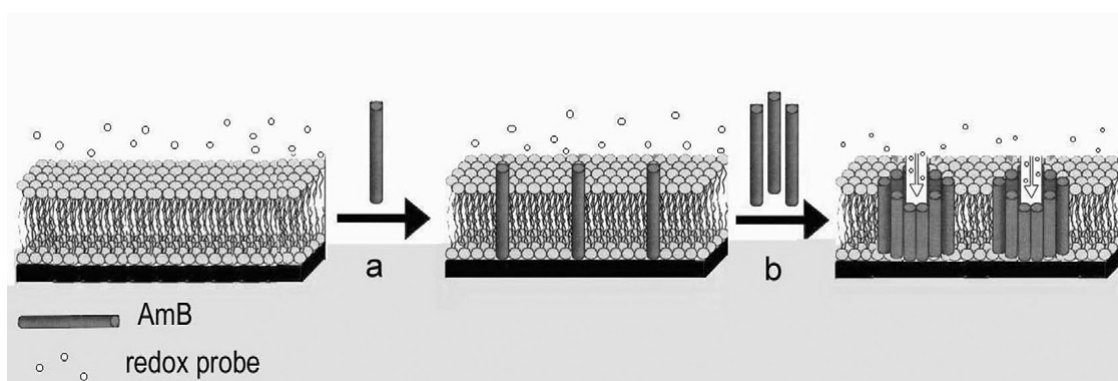


Figura 1.- Proceso de formación de canales iónicos en el electrodo de carbono sobre el que se soporta el modelo de membrana bicapa de fosfatidilcolina.

(a) A bajas concentraciones, las moléculas de anfotericina B se encuentran aisladas por las moléculas lipídicas, no pudiendo generar canales iónicos en la membrana en el ensayo de oxido-reducción.

(b) Cuando alcanzan un estado de agregación relativamente elevado, las moléculas de anfotericina B se agrupan para formar canales iónicos.

Al alcanzar concentraciones de anfotericina B de $5 \cdot 10^{-6}$ M en el medio se observa, en el caso de aquellas membranas que contienen colesterol y DMPC en su composición, un aumento drástico de los valores de amperimetría, apareciendo los primeros canales iónicos. Los valores máximos aparecen al alcanzar concentraciones $2 \cdot 10^{-5}$ M en el caso de las membranas compuestas por ergosterol y DMPC mientras que, en las membranas formuladas con

colesterol y dimiristoilfosfatidilcolina o únicamente por DMPC, los valores de máxima amperimetría aparecen cuando la concentración máxima de anfotericina B es de $5 \cdot 10^{-5}$ M (Huang, W. y col., 2002).

Con el fin de determinar los parámetros bioquímicos a analizar y así poder evaluar la posible acumulación que podrían tener los distintos regímenes de administración se han estudiado también los parámetros de toxicidad que presentan distintas formulaciones de anfotericina B, encontrando diferentes trabajos donde se describen otras alteraciones a nivel renal, hepático y en el equilibrio electrolítico. En general, la alteración de los órganos es más frecuente y su grado de intensidad suele ser más elevado al administrar dosis múltiples de anfotericina B.

La administración de dosis múltiples de las distintas formulaciones de anfotericina B origina alteraciones renales, siendo estos efectos más frecuentes en las formulaciones de anfotericina B dimérica comercializadas como la Fungizona[®]. Los efectos adversos renales se evalúan al analizar parámetros bioquímicos como son la creatinina y el nitrógeno ureico. Sin embargo, la alteración renal también puede observarse al realizar estudios histopatológicos del tejido.

La alteración de los valores de creatinina y nitrógeno ureico es mayor al administrar dosis repetidas y elevadas de anfotericina B. De este modo, Fielding, R.M. y col., 1992, administraron a perros de raza beagle durante catorce días consecutivos distintas dosis de una dispersión coloidal con sulfato de colesterilo que presenta un tamaño homogéneo de partícula (93 ± 2 nm). Estos autores obtienen valores normales o cercanos a la normalidad de estos parámetros renales tras la administración de dosis de 0,6 y 1,2 mg/kg/día de la dispersión coloidal. Sin embargo, el tratamiento con dosis superiores de anfotericina B de esta formulación (2,5 y 5 mg/kg/día) presenta un aumento significativo en los valores de nitrógeno ureico y creatinina, encontrándose también valores aumentados cuando se administran dosis de 0,6 mg/kg/día anfotericina B dimérica (Fungizona[®]). Los parámetros asociados con la

toxicidad renal de esta dispersión coloidal demostraron ser los más afectados en función de las variaciones de las dosis administradas.

A nivel tisular, Fielding, R.M. y col., 1992, observaron alteraciones renales al final del estudio en aquellos animales tratados con dosis de 5 mg/kg/día de anfotericina B en forma de dispersión coloidal y con 0,6 mg/kg/día de Fungizona[®]. Entre ellos, se observaron daños leves a moderados a nivel tubular como, por ejemplo, degeneración, necrosis y pérdida del epitelio tubular proximal.

Los estudios realizados por Larabi, M. y col., 2004, comparan la administración de anfotericina B poliagregada en un complejo lipídico similar al Abelcet[®] pero con un tamaño inferior de partícula frente a la formulación dimérica de Fungizona[®]. Los pesos corporales de los animales que sobrevivieron al final del ensayo fueron similares en todos los grupos, independientemente de si habían recibido algún tratamiento o las formulaciones control que habían recibido solución salina. No se observaron alteraciones significativas en el peso de los riñones ($0,160 \pm 0,014$ g a $0,168 \pm 0,028$ g), excepto el marcado incremento del peso de los riñones tras la administración de dosis de 20 mg/kg/día de anfotericina B en complejo lipídico ($0,182 \pm 0,009$ g) y de 0,5 mg/kg/día de Fungizona[®] ($0,177 \pm 0,019$ g).

Khan, M.A. y Owais, M., 2006, determinaron la toxicidad renal de la anfotericina B poliagregada liposómica con un tamaño de partícula comprendido entre 50 y 100 nm. En este trabajo, se administraron dosis de 5 mg/kg/día durante tres días consecutivos a ratones inmunocompetentes BALB/c hembras previamente infectados por *C. albicans*. Los niveles de creatinina sérica y de nitrógeno ureico resultaron menores en aquellos ratones que habían recibido las formulaciones de anfotericina B liposómicas frente al grupo de anfotericina B con desoxicolato de sodio, administrando dosis de 1 mg/kg/día y donde los valores de los parámetros de toxicidad renal corresponden con el doble de los valores obtenidos al administrar las formulaciones liposómicas. Es importante destacar que, tras la administración

de las diferentes formulaciones de anfotericina B, en todos los casos se produce un incremento de los niveles de creatinina y del nitrógeno ureico. Estos resultados nos llevan a seleccionar estos parámetros renales como los más idóneos a controlar durante todos los tratamientos que se realizan en esta parte del estudio experimental.

La disminución de los parámetros de alteración renal tras la administración de anfotericina B liposómica es debida a una mayor unión de la anfotericina liposómica a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que son captadas por el sistema retículo endotelial. En estos casos, se observa una mayor captación por parte de los macrófagos esplénicos y hepáticos, reduciendo así la toxicidad renal y mejorando el índice terapéutico. Sin embargo, la anfotericina B libre presenta una unión con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que presentan una mayor afinidad por el sistema renal donde existe un elevado número de receptores para las LDL. La interacción entre la anfotericina B, las LDL y los receptores es considerada como uno de los factores más influyentes para que la toxicidad renal sea dosis dependiente (Khan, M.A. y Owais, M.; 2006).

La determinación de la alteración hepática tras la administración de dosis múltiples de anfotericina B se lleva a cabo mediante el estudio de enzimas hepáticas como la aspartato aminotransferasa (AST) o glutamil oxalacetato transferasa (GOT), la alanino aminotransferasa (ALT) o glutamil piruvato transferasa (GPT) y la fosfatasa alcalina.

Fielding, R. M. y col., 1992, determinaron la alteración hepática mediante el análisis de las enzimas ALT y AST. Éstas se encontraban elevadas de manera significativa, mostrando valores de 252 y 98 UI/l respectivamente, tras la administración en dosis múltiple durante catorce días de 2,5 mg/kg/día de anfotericina B poliagregada en forma de dispersión coloidal. Estos valores aumentan a 273 UI/L para la ALT y 124 UI/L para la AST cuando la dosis se incrementa a 5 mg/kg/día. Estas formulaciones liposomiales poliagregadas presentan una menor toxicidad hepática si se comparan con dosis de 0,6 mg/kg/día de anfotericina B dimérica comercializada como Fungizona[®] que dio

lugar a elevados valores de ALT (717 IU/L) y de AST (295 IU/L). Estos valores confirman la existencia de un mayor daño hepático en las formulaciones con la forma dimérica de la anfotericina B (Fungizona®).

Gondal, J. A. y col., 1989, realizaron el tratamiento de candidiasis sistémicas en ratones con anfotericina B a los que se administra tres dosis de anfotericina B (los días 3, 6 y 9 post-infección). Estos autores estudian la toxicidad hepática mediante la determinación de la GOT, GPT y lactato deshidrogenasa séricas tras la administración de liposomas de anfotericina (en dosis de 5; 6,5 y 8,5 mg/kg) o en formulaciones con desoxicolato de sodio (en dosis de 1 y 1,5 mg/kg). En todas las formulaciones los niveles de transaminasas se encontraron ligeramente elevados frente al control al final del ensayo independientemente del tratamiento y de la dosis administrada. Sin embargo, los niveles de lactato deshidrogenasa no fueron significativamente diferentes al grupo control tras la administración de los distintos tratamientos.

Larabi, M. y col., 2004, administraron durante veintidós días consecutivos a ratones CD1, Fungizona® (0,5 mg/kg/día), Abelcet® (10 mg/kg/día) y anfotericina B en forma de complejo lipídico (1, 2, 5, 10 y 20 mg/kg/día), y valoraron los parámetros de alteraciones renales (creatinina y urea), hepáticas (AST y ALT) y del hematocrito. Aunque no se observaron alteraciones renales en ninguno de los grupos, los valores de las enzimas hepáticas (AST y ALT) se encontraban alteradas en todos los casos aumentando el valor de los controles hasta tres o cuatro veces tras la administración de la anfotericina B en forma de complejo lipídico independientemente de la dosis administrada. La disminución de los valores de hematocrito fue dosis dependiente al administrar la anfotericina B en forma de complejo lipídico. Esta disminución era significativa ($p < 0.05$) frente a los valores obtenidos en el grupo control ($48,7 \pm 1,5\%$) al administrar dosis de 10 mg/kg/día de esta formulación, alcanzando niveles de $42,0 \pm 2,1\%$. Los niveles de hematocrito se encontraban también significativamente disminuidos ($p < 0.05$) tras la administración de Fungizona® ($41,0 \pm 0,0\%$) y Abelcet® ($41,5 \pm 2,2\%$). Finalmente, el peso de los hígados en los distintos grupos se mantuvo con valores comprendidos entre $1,40 \pm 0,16$ g y 1,78

± 0,20 g sin que se observasen diferencias entre la Fungizona[®], el complejo lipídico y el Abelcet[®].

De todos estos trabajos se puede concluir que en los estudios farmacéuticos de aquellas formulaciones en las que exista una mayor captación de los macrófagos esplénicos y hepáticos como es la anfotericina B liposómica (Khan M.A. y Owais. M, 2006) es necesario evaluar distintos parámetros de hepatotoxicidad como las transaminasas ALT y AST y el peso del hígado que presentan los distintos grupos de animales.

La mayoría de los siguientes trabajos estudiados están realizados en humanos y muestran resultados de toxicidad similares a los realizados en roedores. Así, Ellis M., 2008, en un estudio con pacientes con neutropenia persistente observa que la administración posológica de una dosis de 10 mg/Kg seguida de dos dosis de 5 mg/Kg (en días 1, 3 y 6 respectivamente) demuestra ser tan eficaz como el régimen estándar de 3 mg/Kg/día durante periodos mas prolongados. Este tipo de tratamientos de dosis mayores espaciadas se ofrece como una alternativa que presenta como ventaja un menor coste y una mayor aceptación por parte de los pacientes.

Sin embargo, es evidente que la administración de dosis elevadas de anfotericina B debe ser evaluada siempre en cuanto al efecto tóxico que produce. En este sentido Gubbins, P.O. y col., 2009, realizaron un estudio con pacientes sometidos a trasplantes con células madre a los que se les administra anfotericina B en forma de liposomas con carácter profiláctico. Los regímenes posológicos fueron 1 mg/kg/día, 7,5 mg/kg/semana o una dosis única de 15 mg/Kg. Es de destacar que el 31% de los pacientes presentó nefrotoxicidad antes de finalizar el estudio y esta nefrotoxicidad apareció significativamente antes en los pacientes que recibieron una dosis única o semanal. Sin embargo, los niveles de transaminasas fueron similares en los diferentes grupos.

En base a todos estos trabajos, se decide realizar un estudio de eficacia y toxicidad con la administración de una o dos dosis elevadas de anfotericina B como dosis de choque (10 mg/kg) en intervalos posológicos de una semana, seguidas de dosis de mantenimiento (3 mg/kg). En todos los casos los tratamientos fueron de 4 semanas de duración. Así mismo incluyeron grupos de estudio tratados con AmBisome[®] y Fungizona[®].

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- *Materiales.*

2.1.1.- Productos y reactivos.

Tanto la anfotericina B (AMB) como la especialidad farmacéutica Fungizona[®] (formulación comercializada de anfotericina B con desoxicolato) fueron suministradas por Bristol Myers, Squibb (Barcelona, España). El desoxicolato de sodio (DCH) fue suministrado por Fluka Chemie A.G. (Buchs, Suiza). La especialidad farmacéutica AmBisome[®] (formulación comercializada de liposomas compuestos de anfotericina: fosfatidilcolina: colesterol: distearoilfosfatidilglicerol 50:213:52:84 p/p/p/p) se encuentra comercializada por UCB-Pharma (Bruselas, Bélgica).

El suero fisiológico Vitulia (cloruro sódico al 0,9%) se encuentra comercializado por Laboratorios Ern, S. A. (Barcelona, España) y el agua purificada estéril fue obtenida por un sistema Milli-Q (Millipore, USA).

2.1.2.- Material biológico.

Animales:

El ensayo se lleva a cabo con ratones machos ICR (25-30 g) después de un periodo de aclimatación de 7 días. Los animales son separados en grupos de 7 animales cada uno y mantenidos durante el tiempo de experimentación en jaulas de plástico con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas en el laboratorio de experimentación animal de la Universidad Complutense de acuerdo con los principios de protección de animales de la directiva 86/609/EU de la legislación de la Unión Europea.

Inóculo:

La cepa de *Candida albicans* SC5314 fue empleada en todos los experimentos. Para los estudios de infección, la cepa fue sembrada en placa agar de extracto de levadura y dextrosa (Yeast Extract-Dextrose o YED), lavada dos veces con tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline o PBS) y diluido con el mismo tampón hasta obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ unidades formadoras de colonias (cfu)/ml.

2.2.- Métodos.

2.2.1.- Modelo de infección.

La infección se realiza mediante la administración de 0,5 ml de la suspensión de la cepa SC5314 de *Candida albicans*, cuya concentración es $2 \cdot 10^6$ cfu/ml, a través de la vena lateral de la cola de los ratones 72 horas antes de administrar el tratamiento.

2.2.2.- Administración del tratamiento.

El tratamiento comienza transcurridas 48 horas tras la inoculación de *Candida albicans* en los ratones. Se procede a la administración de 0,2 ml de cada formulación a los ratones que constituyen cada uno de los grupos de tratamiento a través de la vena lateral de la cola. Las distintas formulaciones fueron administradas una vez por semana, recibiendo cada uno de los grupos cuatro dosis de tratamiento.

Los grupos en los que se clasificaron los ratones se dividen en grupos de referencia y grupos de las formulaciones estudiadas.

Los grupos de referencia empleados en estos estudios de dosis múltiple incluyeron un grupo control (no inoculado previamente con *Candida albicans*) al que se le administró suero salino al 0,9% y dos grupos tratados con formulaciones comerciales que fueron Fungizona[®], administrada en dosis de 1 mg/kg y AmBisome[®], administrado en dosis de 5 mg/kg como se muestra en la Tabla 1.

FORMULACIÓN	DOSIS ADMINISTRADA (mg/kg)	NÚMERO DE DOSIS ADMINISTRADAS
Control	0	4
AmBisome [®]	5	4
Fungizona [®]	1	4

Tabla 1.- Relación de formulaciones de referencias administradas en el estudio de eficacia y toxicidad en el tratamiento de la candidiasis sistémicas, dosis y número de dosis administradas.

Los tratamientos de dosis múltiples se encuentran indicados en la Tabla 2 donde se indican no sólo las proporciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio sino también las dosis y el número de dosis recibidos en cada caso.

FORMULACIONES OBJETO DE ESTUDIO
4* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg)
4* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)
1* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 3*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)
2*AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 2*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)
4*AMB:DCH 1:4 (5 mg/kg)

Tabla 2.- Relación de formulaciones objeto de estudio de eficacia y toxicidad en el tratamiento de la candidiasis sistémicas. AMB:DCH corresponde a la proporción de anfotericina B: desoxicolato de sodio administrada en cada caso. Entre paréntesis aparece la dosis administrada de anfotericina B en cada tratamiento que reciben los sujetos.

2.2.3.- Determinación de la eficacia y toxicidad de los tratamientos.

Las eficacias de los tratamientos se determinan el día 27, tiempo establecido desde la primera administración de cada uno de los tratamientos mediante el estudio de la supervivencia tanto diaria como al final del ensayo. Además, se estudian los tiempos de supervivencia media (Mean Survival Time o MST).

Debido a la mayor afinidad de *C. albicans* por el cerebro y los riñones, se realizan estudios de colonización a nivel cerebral y renal con el fin de conocer el aclaramiento del patógeno y la efectividad de los tratamientos administrados para su erradicación mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por gramo.

El número de unidades formadoras de colonias (cfu) se conoce tras la siembra de los riñones y del cerebro homogeneizados de los ratones. Para ello, los ratones son sacrificados tras haber sido anestesiados previamente, extrayendo asépticamente tanto los riñones como el cerebro. La homogeneización de los órganos fue llevada a cabo en 10 ml de tampón fosfato salino (PBS). Los órganos homogeneizados fueron sembrados en agar levadura-dextrosa-cloranfenicol y se incuban durante 48 horas a 37°C.

Sin embargo, a nivel renal, es necesario considerar no solamente el posible daño originado por el patógeno sino también la nefrotoxicidad de la anfotericina B, que puede afectar a la funcionalidad renal. Por esta razón, se analizaron los valores de creatinina y nitrógeno ureico en plasma y se realizaron estudios para evaluar su peso y morfología.

Finalmente, la determinación de parámetros hepáticos, como son la AST y la ALT, permite determinar la toxicidad de los tratamientos en este tejido.

3. RESULTADOS.

3.1.- Estudio de la morfología y funcionalidad renal y hepática.

A pesar de la presencia de infección, los animales tratados con las formulaciones de referencia Fungizona® y AmBisome® así como, los tratados con las nuevas formulaciones estudiadas, presentan, en la mayoría de los casos, un aspecto normal en sus riñones (Figura 1) con pesos medios por riñón de $0,238 \pm 0,024$ g, resultado similar al que presenta el grupo control de animales no infectados y al encontrado por otros autores (Larabi, M. y col., 2004). Solamente dos ratones presentaban una atrofia en uno de los riñones (Figura 2). Estos habían recibido una dosis de ataque de anfotericina B (10 mg/kg) de una formulación en la que la proporción de principio activo frente al desoxicolato de sodio era 1:1,5 y tres dosis de mantenimiento de anfotericina B (3 mg/kg) de una formulación con una proporción de la sustancia activa frente al desoxicolato de sodio de 1:0,8.



Figura 1.- Imagen de riñones morfológicamente normales tras la administración a ratones ICR macho tratados con la mayoría de los animales tratados con las distintas formulaciones.



Figura 2.- Alteraciones en el tamaño de los riñones de uno de los ratones ICR macho tratado con una dosis de 10 mg/kg de anfotericina B administrado junto al desoxicolato de sodio en una proporción 1:1,5 y tres dosis de 3 mg/kg de anfotericina B administrada junto al desoxicolato de sodio en una proporción 1:0,8.

Por otra parte, la morfología hepática de todos los animales resultó ser normal, con pesos medios de $1,525 \pm 0,149$ g, sin observarse alteraciones con respecto al grupo control de animales no infectados.

A pesar de que los objetivos del estudio consistían en la determinación de la eficacia y toxicidad de dosis múltiples de anfotericina B y desoxicolato de sodio en el tratamiento de candidiasis sistémicas, en el transcurso del ensayo se observó, en algunas formulaciones, la aparición de una zona necrosada en el punto de inyección, observándose en los casos más severos que, tras varias administraciones, se llega a producir una necrosis parcial de las colas. Sin embargo, a pesar de estas lesiones locales, los ratones mostraban un aspecto saludable.

Concretamente, la aparición de necrosis en la zona de inyección se observa tras la administración de alguno de los siguientes tratamientos:

1. La administración de 5 mg/kg/semana de anfotericina B en una formulación donde la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio es 1:4. La gravedad de esta necrosis hizo necesaria la suspensión del tratamiento a partir de la segunda semana.

2. Cuatro dosis de 10 mg/kg/semana de una formulación de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:1,5.
3. Una dosis de 10 mg/kg de anfotericina B, administrada junto con desoxicolato sódico en proporción 1:1,5 y tres dosis de 3 mg/kg/semana de anfotericina B junto con desoxicolato sódico en proporción 1:0,8.
4. Dos dosis de 10 mg/kg/semana de sustancia activa, administrada en una proporción 1:1,5 con el desoxicolato de sodio y dos dosis de 3 mg/kg/semana de anfotericina B de una formulación con proporción 1:0,8 frente al desoxicolato sódico.

Es importante destacar que algunos de ratones mostraron inicialmente alteraciones neurológicas que cursaron con inclinación de la cabeza y andar errático, que desaparecen a lo largo del tratamiento con las formulaciones de anfotericina B.

Por otra parte como ya se ha comentado, la toxicidad también puede ser evaluada mediante determinación de parámetros plasmáticos como la creatinina y del nitrógeno ureico para la toxicidad renal, y el análisis de la aspartato aminotransferasa (AST) y de la alanino aminotransferasa (ALT) para evaluar la hepatotoxicidad.

Los valores del estudio de toxicidad renal y hepática del AmBisome[®] y la Fungizona[®] frente al control de animales no infectados se muestran en la tabla 3. Los parámetros de toxicidad renal y hepática obtenidos tras la administración con dosis de 3 y 10 mg/kg/semana de las formulaciones de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporción 1:0,8 y 1:1,5 respectivamente se encuentran en la tabla 4, donde se reflejan los parámetros bioquímicos tras cuatro dosis de cada tratamiento. Las tablas 5, 6 y 7 muestran la evolución de los distintos parámetros bioquímicos conforme aumenta el número de dosis administradas.

FORMULACIONES (n° dosis / formulación)	NITRÓGENO UREICO ± S. D. (mg/dl)	CREATININA ± S. D. (mg/dl)	AST ± S. D. (UI/l)	ALT ± S. D. (UI/l)
4 * Control	25,97 ± 2,55	0,23 ± 0,06	108,00 ± 5,57	39,33 ± 6,03
4 * AmBisome®	44,17 ± 7,77 *	0,20 ± 0,00	171,33 ± 3,06 *	57,33 ± 7,57 *
4 * Fungizona®	28,00 ± 2,55	0,35 ± 0,06 *	171,00 ± 7,00 *	54,00 ± 8,66 *

Tabla 3.- Relación de los valores de toxicidad renal y hepática obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones de referencia.

S. D. corresponde a la desviación estándar.

***Probabilidad “t student” significativa (p< 0,05) frente a animales control (sin infección).**

FORMULACIONES (n° dosis / formulación)	NITRÓGENO UREICO ± S. D. (mg/dl)	CREATININA ± S. D. (mg/dl)	AST ± S. D. (UI/l)	ALT ± S. D. (UI/l)
4*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	37,20 ± 2,36*	0,23 ± 0,05	150,67 ± 9,71 *	53,33 ± 5,13 *
4*AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg)	20,77 ± 3,49	0,30 ± 0,00	116,00 ± 8,89	34,67 ± 5,03

Tabla 4.- Relación de los valores de toxicidad renal y hepática obtenida tras la administración de dosis múltiples de las formulaciones objeto de estudio.

S. D. corresponde a la desviación estándar.

***Probabilidad “t student” significativa (p< 0,05) frente a animales control (sin infección).**

Nº DE DOSIS RECIBIDAS	Nº RATONES	NITRÓGENO UREICO ± S. D. (mg/dl)	CREATININA ± S. D. (mg/dl)	AST ± S. D. (UI/l)	ALT ± S. D. (UI/l)
1	3	21,50 ± 1,73*	0,40 ± 0,00 *	269,33 ± 13,80 *	71,33 ± 4,73 *
2	3	23,00 ± 2,36	0,33 ± 0,06	239,67 ± 19,35 *	64,67 ± 4,51 *
3	2	25,30 ± 2,85	0,33 ± 0,06	223,67 ± 25,89 *	51,67 ± 6,03 *
4	4	20,77 ± 3,49	0,30 ± 0,00	116,00 ± 8,89	34,67 ± 5,03

Tabla 5.- Datos de toxicidad renal y hepática obtenidos tras la administración de las sucesivas dosis en los tratamientos de candidiasis sistémicas con dosis de 10 mg/kg de anfotericina B administrada junto desoxicolato de sodio en una proporción 1:1,5.

S. D. corresponde a la desviación estándar.

***Probabilidad “t student” significativa (p< 0,05) frente a animales control (sin infección).**

Nº DE DOSIS RECIBIDAS	Nº RATONES	NITRÓGENO UREICO ± S. D. (mg/dl)	CREATININA ± S. D. (mg/dl)	AST ± S. D. (UI/l)	ALT ± S. D. (UI/l)
1	3	21,50 ± 1,73*	0,40 ± 0,00*	269,33 ± 13,80 *	71,33 ± 4,73 *
2	2	32,40 ± 10,18	0,30 ± 0,10	174,33 ± 24,58 *	41,33 ± 12,05
3	3	27,37 ± 4,40	0,30 ± 0,00	189,67 ± 34,93 *	55,33 ± 11,15
4	5	29,03 ± 6,93	0,34 ± 0,06 *	161,75 ± 14,89 *	45,50 ± 3,42

TABLA 6.- Datos de toxicidad renal y hepática obtenidos tras la administración de las sucesivas dosis en los tratamientos de candidiasis sistémicas con una primera dosis de 10 mg/kg de anfotericina B administrada junto desoxicolato de sodio en una proporción 1:1,5 y con tres dosis posteriores de 3 mg/kg de anfotericina de B administrada junto desoxicolato de sodio en una proporción 1:0,8.

S. D. corresponde a la desviación estándar.

*Probabilidad “t student” significativa ($p < 0,05$) frente a animales control (sin infección).

Nº DE DOSIS RECIBIDAS	Nº RATONES	NITRÓGENO UREICO ± S. D. (mg/dl)	CREATININA ± S. D. (mg/dl)	AST ± S. D. (UI/l)	ALT ± S. D. (UI/l)
1	3	21,50 ± 1,73*	0,40 ± 0,00*	269,33 ± 13,77 *	71,33 ± 4,73 *
2	3	23,00 ± 2,36	0,33 ± 0,06	239,67 ± 19,35 *	64,67 ± 4,51 *
3	3	32,40 ± 10,18	0,30 ± 0,10	174,33 ± 24,58 *	41,33 ± 12,06
4	4	24,13 ± 4,63	0,25 ± 0,06	151,67 ± 13,05 *	55,50 ± 5,69 *

TABLA 7.- Datos de toxicidad renal y hepática obtenidos tras la administración de las sucesivas dosis en los tratamientos de candidiasis sistémicas con dos dosis iniciales de 10 mg/kg de anfotericina B administrada junto desoxicolato de sodio en una proporción 1:1,5 y dos dosis posteriores de 3 mg/kg de anfotericina de B administrada junto desoxicolato de sodio en una proporción 1:0,8.

S. D. corresponde a la desviación estándar.

***Probabilidad “t student” significativa (p< 0,05) frente a animales control (sin infección).**

La alteración de la funcionalidad renal se estudia mediante la determinación tanto de la creatinina como del nitrógeno ureico presente en plasma.

Los resultados obtenidos de ambos parámetros de toxicidad renal tras el tratamiento con AmBisome[®] muestran en primer lugar valores de creatinina ($0,20 \pm 0,00$ mg/dl) similares a los del grupo control ($0,23 \pm 0,06$ mg/dl), mientras que los valores de nitrógeno ureico se encuentran significativamente ($p < 0,05$) elevados ($44,17 \pm 7,77$ mg/dl) lo que coincide con lo observado previamente por otros autores (Espada, R. y col., 2008b; Larabi, M. y col., 2004 y Olson, J.A. y col., 2008). Los parámetros de hepatotoxicidad AST y ALT analizados tras el tratamiento con AmBisome[®] ($171,33 \pm 3,06$ UI/l y $57,33 \pm 7,57$ UI/l respectivamente) fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los observados en el grupo control. En el caso de los tratamientos con Fungizona[®], el parámetro más relevante es su elevado valor de creatinina ($0,35 \pm 0,06$ mg/dl), indicativo de una mala funcionalidad renal. Por otra parte, esta formulación presenta valores de AST y ALT ($171,00 \pm 7,00$ UI/l y $54,00 \pm 8,66$ UI/l respectivamente) que también difieren significativamente ($p < 0,05$) de los del grupo control, aun cuando la dosis administrada de anfotericina B fue 5 veces inferior a la administrada con AmBisome[®]. Las diferencias de los parámetros de toxicidad renal y hepática observadas tras la administración de ambas formulaciones comerciales de anfotericina B posiblemente indica una distribución en el organismo diferente del fármaco a partir la formulación liposomal lo que coincide con lo observado por otros autores (Khan, M.A. y Owais, M.; 2006; Larabi, M. y col., 2004).

La administración de cuatro dosis de 3 mg/kg de la formulación de anfotericina B y desoxicolato de sodio 1:0,8 muestra unos resultados de creatinina ($0,23 \pm 0,05$ mg/dl) no alterados frente al control como ocurría tras la administración de la formulación comercial AmBisome[®]. Además, sus altos valores de nitrógeno ureico sugieren la existencia de mecanismos similares de recirculación in vivo a los de la formulación patrón de AmBisome[®]. Por otra parte los valores de AST y ALT elevados pueden ser atribuidos tanto a la hepatotoxicidad de la anfotericina B como a la candidiasis.

La administración de cuatro dosis elevadas de anfotericina B (10 mg/kg), empleando formulaciones que contienen altas proporciones de desoxicolato de sodio (1:1,5) produce mayores valores de nefrotoxicidad, como se puede observar en la tabla 4, alcanzando niveles de creatinina de $0,30 \pm 0,00$ mg/dl aunque sin diferencia significativa con el grupo control ($p > 0,05$), sin que tampoco existan diferencias significativas en sus valores de AST y ALT frente al grupo control ($p > 0,05$). Además, es de destacar, que la forma poliagregada de esta formulación permite la administración de dosis diez veces superiores a la de la Fungizona con mejores resultados de todos los parámetros bioquímicos analizados. Los resultados elevados de creatinina que aparecen tras la primera dosis (Tabla 5) sugieren que estos mayores valores de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad podrían ser consecuencia de su alto nivel de infección. Así mismo, el hecho de que tras 4 semanas de tratamiento (4*AMB:DCH 1:1,5 y 10 mg/kg) las enzimas AST y ALT muestren valores similares al grupo control confirma que en la formulación anteriormente administrada de 4*AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg) los altos valores de estas enzimas se deben atribuir a la infección y no a la toxicidad de la anfotericina B.

La administración sucesiva de una segunda y una tercera dosis de AMB:DCH 1:1,5 y 10 mg/kg (ver tabla 5) hacen que disminuyan progresivamente los valores de AST y ALT aunque son significativamente ($p < 0,05$) superiores a los mostrados por el grupo control. Siendo necesaria la cuarta dosis para alcanzar valores cercanos a la normalidad ($116,00 \pm 8,89$ UI/l de AST y $34,67 \pm 5,03$ UI/l de ALT). Así mismo, los valores de creatinina mejoran tras la administración de las cuatro dosis AMB:DCH 1:1,5 y 10 mg/kg pasando de valores desde 0,40 mg/dl hasta 0,30 mg/dl. Estos resultados permiten considerar que esta formulación presenta una elevada nefrotoxicidad al inicio del tratamiento y que mejora claramente a lo largo del mismo. Por otra parte es importante destacar que, con este tratamiento, no se produjo ninguna muerte en los ratones y que los valores de creatinina, AST y ALT son mejores que los que se obtienen tras el tratamiento con Fungizona[®].

Sin embargo, la toxicidad local (necrosis) en la zona de inyección con este tratamiento de 4*AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg/semana), hacen interesante la elaboración de un nuevo estudio combinando una o varias dosis altas de anfotericina B, consideradas como dosis de choque, donde la proporción de anfotericina B respecto al desoxicolato sódico sea 1:1,5, con dosis inferiores que se pueden considerar como dosis de mantenimiento donde la proporción de sustancia activa frente al tensioactivo sea de 1:0,8.

Al administrar una primera dosis elevada de anfotericina B (10 mg/kg) con proporciones altas de desoxicolato sódico (1:1,5) seguida de tres dosis bajas (3 mg/kg) con proporciones menores de desoxicolato de sodio (1:0,8) se observaron menos efectos tóxicos locales en la zona de administración que tras la administración del tratamiento 4*AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg/semana). En cuanto a los parámetros bioquímicos (ver tabla 6) se observa que los valores de creatinina son significativamente ($p < 0,05$) elevados al final del estudio ($0,34 \pm 0,05$ mg/dl) lo que implica un efecto nefrotóxico. Se han encontrado efectos adversos similares en el análisis de la hepatotoxicidad en estos estudios, alcanzando niveles de $161,75 \pm 14,89$ UI/l en el caso de la AST y de $45,50 \pm 3,42$ UI/l para la ALT). En ambos casos se observa que sus valores de creatinina, AST y ALT al final del estudio son mejores que los que presenta la formulación de Fungizona[®] (ver tabla 3). La nefro y hepatotoxicidad que presenta este tratamiento no parece que puedan ser atribuidas en este caso a la anfotericina B ya que el tratamiento con cuatro dosis de AMB:DCH 1:1,5 y 10 mg/kg no presentaba al final del estudio esta toxicidad hepática aun habiéndose administrado dosis de fármaco mas de tres veces superiores y además su nefrotoxicidad fue menor que este tratamiento con dosis combinadas. Por lo tanto, en este caso, tanto la nefro como la hepatotoxicidad se pueden atribuir posiblemente a una incompleta erradicación de la infección.

En el caso del tratamiento en el que se administran dos dosis elevadas de anfotericina B (10 mg/kg/semana) con proporciones altas de desoxicolato (1:1,5), seguidas de dos dosis de 3 mg/kg con proporciones menores de desoxicolato sódico (1:0,8) produjo menor toxicidad local en la zona de

inyección que el tratamiento 4*AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg/semana). En cuanto a la nefrotoxicidad, se obtiene una mejora con respecto al tratamiento con una dosis de choque y tres de mantenimiento ya que los valores de creatinina pasan de valores de $0,34 \pm 0,05$ a $0,25 \pm 0,06$ mg/dl en el tratamiento con dos dosis de choque y dos de mantenimiento (ver tablas 6 y 7 respectivamente). Este hecho se atribuye a un mejor efecto erradicador de la infección de *C. albicans*. Este tratamiento de dos dosis de choque y dos de mantenimiento presenta valores de AST y ALT elevados aunque van disminuyendo a lo largo del mismo. Dado que la formulación 4*AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg presentó al final del estudio valores normales de AST y ALT, nuevamente se concluye que los valores elevados en este caso se deben atribuir principalmente a la infección y no tanto al fármaco.

Estos resultados indican que sería adecuado realizar el tratamiento lo antes posible para disminuir la nefro y hepatotoxicidad producidas por la infección por *C. albicans*.

3.2. Estudio de la eficacia de los tratamientos de anfotericina B y desoxicolato de sodio.

La eficacia de los tratamientos está determinada por la supervivencia de los animales a lo largo y al final del ensayo tanto para las formulaciones de referencia, el AmBisome[®] y la Fungizona[®], como las nuevas formulaciones objeto de estudio. Además, al finalizar los estudios se realizaron las siembras de los riñones y los cerebros previamente homogeneizados tras el sacrificio de los roedores. Estos órganos son los más susceptibles de padecer infecciones por *Candida* spp.

La supervivencia de los distintos tratamientos se muestra en la Figura 3.

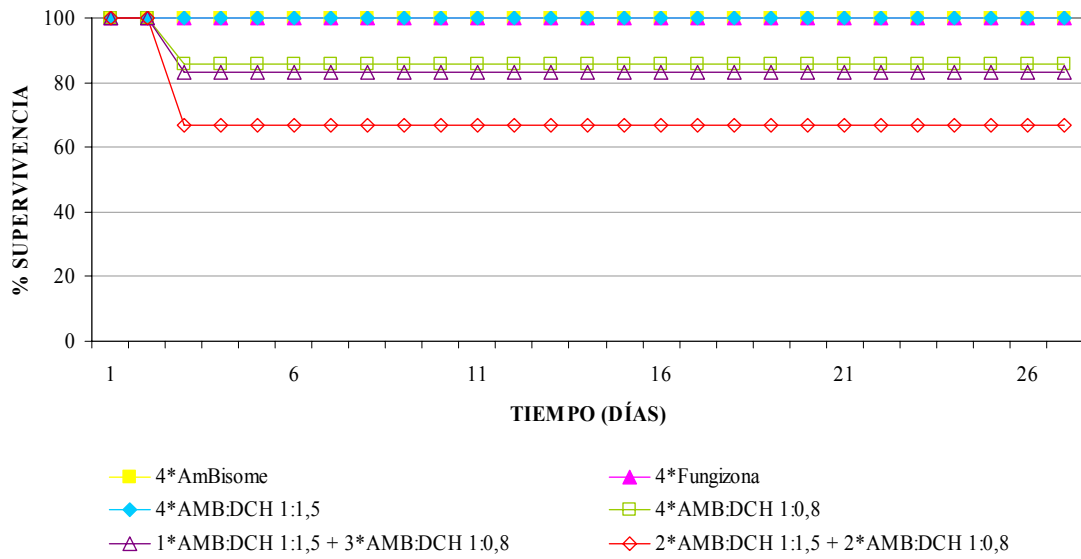


Figura 3.- Supervivencia diaria expresada en porcentaje. AMB:DCH representa la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio en cada una de las formulaciones objeto de estudio y el número de dosis que reciben en los distintos tratamientos.

En la figura 4 se muestra la supervivencia tras cada una de las formulaciones al final del estudio, transcurridos los 27 días desde el inicio de los tratamientos.

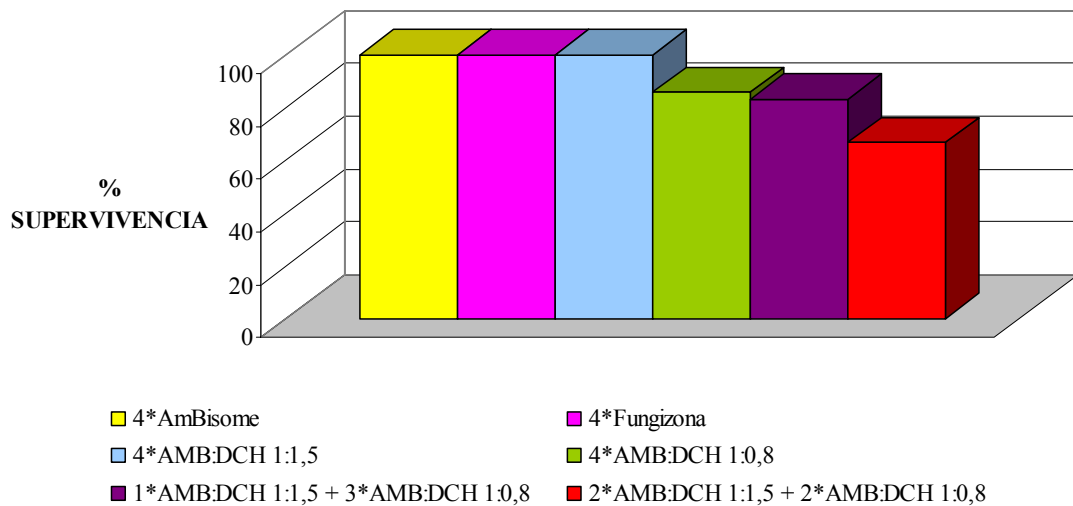


Figura 4.- Supervivencia expresada en porcentaje transcurrido el ensayo. AMB:DCH representa la proporción de anfotericina B y desoxicolato de sodio en cada una de las formulaciones objeto de estudio así como el número de dosis que reciben en los distintos tratamientos.

Otro de los parámetros analizados consiste en la determinación de los tiempos medios de supervivencia (Mean Survival Time o MST) para las formulaciones de referencia AmBisome[®] y Fungizona[®] como se indica en la Tabla 8 y para las formulaciones objeto de estudio, indicados en la Tabla 9.

FORMULACIÓN	MST (DÍAS) ± S. D.	Nº RATONES SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
4*AmBisome [®] (5 mg/kg)	> 27,00	3/3
4*Fungizona [®] (1 mg/kg)	> 27,00	4/4

Tabla 8.- Tiempos medios de supervivencia obtenidos al finalizar el ensayo. S. D. corresponde a la desviación estándar obtenida tras la administración de las formulaciones de referencia.

FORMULACIÓN	MST (DÍAS) ± S. D.	Nº RATONES SUPERVIVIENTES/ Nº RATONES INICIALES
4* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg)	> 27,00	3/3
4* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	23,43 ± 9,45	6/7
1* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 3* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	23,00 ± 9,80	5/6
2* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 2* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	19,00 ± 12,39	4/6

Tabla 9.- Tiempos medios de supervivencia obtenidos al finalizar el ensayo. S. D. corresponde a la desviación estándar obtenida tras la administración de las formulaciones objeto de estudio.

La supervivencia de aquellos animales que han recibido las formulaciones de referencia, es decir, AmBisome[®] y Fungizona[®] fue del 100% (MST >27). La supervivencia también fue total en el grupo de ratones que ha recibido como tratamiento la formulación constituida por anfotericina B y desoxicolato de sodio en una proporción 1:1,5 en dosis de 10 mg/kg/semana (MST >27). Esta formulación alcanzaba niveles máximos de supervivencia habiendo recibido los

animales de experimentación una dosis de anfotericina B doble a las administradas en el tratamiento con AmBisome[®] y diez veces superior a la de la Fungizona[®]. Finalmente, se observa como disminuye la supervivencia al administrar como tratamiento cuatro dosis de 3 mg/kg de anfotericina B junto con desoxicolato sódico en proporción 1:0,8, alcanzando niveles de 85,71% (MST 23,43 ± 9,45).

La administración de una dosis de ataque y tres dosis de mantenimiento presenta una supervivencia del 83,33% (MST 23,00 ± 9,80) mientras que la administración de dos dosis de ataque seguidas de dos dosis de mantenimiento disminuye la supervivencia al 66,67% (MST 19,00 ± 12,39). En la Figura 3 se puede observar que la disminución de la supervivencia se origina en todos los grupos de animales durante los tres primeros días del estudio, manteniéndose la supervivencia posteriormente de todos los animales a lo largo del ensayo. Por lo tanto en el caso de los tratamientos de dosis alternas con una o dos dosis de choque seguidas por varias de mantenimiento las diferencias de mortalidad se producen antes de la segunda dosis y por lo tanto en tres de los grupos de tratamiento los animales habían recibido una única dosis de 10 mg de anfotericina B de una misma formulación (AMB:DHC 1:1,5) en el momento de su fallecimiento por lo que esta mortalidad no puede atribuirse a diferencias en el tratamiento sino que debe atribuirse a una diferente respuesta de los animales a la sobreinfección inicial. Una respuesta análoga de mortandad al inicio del estudio fue observada por Espada y col en un modelo de infección por candidiasis en ratones similar (Espada, R. y col., 2008b). Sin embargo, es de destacar que todas las formulaciones permiten la supervivencia de todos los animales desde el tercer día hasta finalizar el estudio.

3.3.- Estudio de la colonización a nivel renal y cerebral por *Candida albicans*.

Otro estudio que permite verificar la eficacia de los tratamientos consiste en la determinación en placa de unidades formadoras de colonias a partir de homogenizados cerebrales y renales.

La determinación de la eficacia de los tratamientos a nivel microbiológico fue realizado previamente por van Etten, E.W.M. y col., 1998, que estudian la administración de dosis múltiples de AmBisome[®] y una dosis única de Fungizona[®] frente a un tratamiento que combina ambas formulaciones en ratones leucopénicos con infección por *C. albicans*. El tratamiento combinado con ambas formulaciones permitió observar una disminución de la infección superior a dos unidades logarítmicas al tercer día post-infección. Estos autores determinaron que la eficacia del tratamiento del AmBisome[®] podía ser mejorada tras la administración de una dosis baja (0,1 mg/kg) de Fungizona[®] en las primeras fases del tratamiento de candidiasis severa.

Otros autores como Espada, R. y col., 2008a, realizan estudios de eficacia tras la administración de anfotericina B poliagregada de dosis de 5 mg/kg los días 3; 10; 17; 25; 32 y 38 post-infección. La administración de estos tratamientos mostró un aclaramiento de la infección en el 25% de los ratones tratados, valor que duplica al obtenido en los roedores que han recibido dosis de 1 mg/kg de Fungizona[®].

En nuestro trabajo, los animales tratados con las formulaciones de referencia, es decir, AmBisome[®] y Fungizona[®] dieron lugar a la ausencia de unidades formadoras de colonias a nivel cerebral. Igualmente los nuevos tratamientos realizados mostraron ausencia de unidades formadoras de colonias a nivel cerebral al final de los mismos a excepción del tratamiento 4* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg). En este caso, el 40% de los roedores que finalizaron el estudio presentan colonización cerebral, alcanzando 2,47

$\pm 0,49$ log cfu/g. Por lo tanto, todos los tratamientos que se inician con dosis de choque de 10 mg de anfotericina B en su forma poliagregada AMB:DCH 1:1,5 son eficaces para erradicar la candidiasis cerebral.

Los niveles de colonización renal presentan una elevada variabilidad dependiendo de la formulación empleada. En la Tabla 10 se muestran los niveles de colonización renal, expresado en log cfu/g.

TRATAMIENTO	Log ₁₀ cfu/g \pm S. D.
4* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg)	—*
4* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg) ¹	5,622 \pm 0,441
1* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 3* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg) ²	5,591 \pm 0,702
2* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 2* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg)	—*

Tabla 10.- Colonización renal de ratones ICR machos infectados por *Candida albicans* tras el tratamiento en dosis múltiple con las formulaciones objeto de estudio, expresada en unidades logarítmicas. S. D. corresponde a la desviación estándar.

¹ indica que uno de los roedores ha presentado un aclaramiento total del patógeno a nivel renal.

² indica que dos roedores han presentado un aclaramiento total del patógeno a nivel renal.

¹ ² Estos ratones no se han incluido en la media.

* indica que todos los roedores han presentado un aclaramiento total de la infección a nivel renal.

En cuanto a los niveles de colonización renal, los resultados son diferentes en función del tipo de tratamiento. La administración de dosis repetidas de 5 mg/kg de AmBisome[®] así como el tratamiento con cuatro dosis de 10 mg/kg de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:1,5 permitieron la erradicación del agente patógeno a nivel renal.

Este mismo buen resultado se obtuvo también al tratar las candidiasis sistémicas tras la administración de dos dosis de 10 mg/kg de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción de 1:1,5 y dos dosis de mantenimiento de 3 mg/kg de anfotericina B administrada junto a desoxicolato sódico en una

proporción 1:0,8. Sin embargo, es de destacar que la ausencia de unidades formadoras de colonias a nivel renal se alcanza en este tratamiento con una dosis similar de anfotericina B total (26 mg/Kg/4 semanas) en el estudio que en el tratamiento con AmBisome[®] (20 mg/Kg/4 semanas) y con una dosis de fármaco menor que en el tratamiento de 4* AMB:DCH 1:1,5 (40 mg/Kg/4 semanas).

La ausencia de unidades formadoras de colonias en todos los órganos al final del estudio sólo se puede explicar en esta última formulación, 2* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 2* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg), si se tiene en cuenta que el descenso en la supervivencia a valores de (66,67%) se produce en los tres primeros días después del tratamiento lo que indica que su muerte se debe a la elevada infección inicial y que posteriormente no se producen nuevas muertes y la candidiasis es erradicada tanto a nivel renal como cerebral.

Los tratamientos con Fungizona[®] presentaron en el 25% de los roedores una elevada colonización (5,697 log cfu/g) a nivel renal.

Tratamientos de dosis múltiples con 3 mg/kg de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en una proporción 1:0,8 no resultan efectivos ya que presentan una colonización a nivel renal de $5,622 \pm 0,441$ log cfu/g en el 80% de los animales. El aclaramiento de la infección tras la administración de una dosis de ataque (10 mg/kg de anfotericina B administrada junto al desoxicolato en proporción 1:1,5) y tres dosis de mantenimiento (3 mg/kg de formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en una proporción 1:0,8) presenta niveles de $5,591 \pm 0,702$ log cfu/g aunque, en este caso, el crecimiento se observa en el 60% de los roedores.

La eficacia encontrada tras la administración de un tratamiento con cuatro dosis repetidas de 10 mg/kg de principio activo en formulaciones de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:1,5 es similar a los tratamientos de referencia. Cuando se combinan dos formulaciones a lo largo

de un tratamiento, únicamente el tratamiento que utiliza dos dosis de ataque de anfotericina B (10 mg/kg) y dos dosis de mantenimiento (3 mg/kg) obtiene buenos resultados de eficacia y menos efectos tóxicos que el tratamiento 1* AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) + 3* AMB:DCH 1:0,8 (3 mg/kg). La administración de una sola dosis de ataque y tres dosis de mantenimiento resulta, por lo tanto, insuficiente para el tratamiento de la candidiasis a nivel renal. Además, si se compara la administración de 3 mg/kg de una formulación de anfotericina B y desoxicolato de sodio frente a la administración de una dosis de ataque de 10 mg/kg de principio activo y tres dosis de mantenimiento se aprecia que los niveles de colonización fueron similares ($5,622 \pm 0,441$ frente a $5,591 \pm 0,702$ log cfu/g), no mejorando la eficacia la administración de la dosis de choque.

4.- DISCUSIÓN.

El aumento de los valores de los parámetros bioquímicos analizados, nitrógeno ureico, creatinina, AST y ALT con los distintos tratamientos está relacionado tanto por la toxicidad de la anfotericina B como por elevados grados de infección de los animales.

La administración de un tratamiento con la anfotericina B en forma poliagregada en dosis bajas (4* AMB:DCH 1:0,8 a 3 mg/kg) mostró parámetros de creatinina similares a los de la formulación de AmBisome[®] aunque este tratamiento ha resultado ser insuficiente para erradicar la candidiasis. Los animales sometidos a este tratamiento mostraron niveles de colonización por *Candida albicans* tanto a nivel renal como cerebral al final del mismo. Por lo tanto, es necesaria la administración de dosis mas elevadas de anfotericina B poliagregada.

El tratamiento con dosis elevadas durante las cuatro semanas de anfotericina B poliagregada (AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg) ha demostrado ser eficaz para erradicar la infección tanto a nivel renal como cerebral aunque los animales presentaron niveles de creatinina ligeramente elevados al final del estudio (0,30 mg/dl) pero que no difieren significativamente ($p < 0,05$) de los obtenidos en el grupo control y que son inferiores a los que presentaron los animales tratados con Fungizona[®] (0,35 mg/dl). Concretamente se observa un descenso de los valores de creatinina de 0,40 mg/dl a 0,3 mg/dl y de AST de 269,33 UI/l a 116,00 UI/l a lo largo del tratamiento. Sin embargo, este tratamiento produce toxicidad local en la zona de inyección, originando una necrosis local que se agrava progresivamente al realizar todas las inyecciones en la misma zona.

Por lo tanto, con la finalidad de disminuir la dosis total de anfotericina B administrada y así su toxicidad local y su ligera alteración renal, se ha estudiado la administración de dos formulaciones diferentes a lo largo del

tratamiento comenzándose con la administración de una o dos dosis de choque con la formulación AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg en los momentos de mayor sobreinfección, para seguidamente continuar con una menor dosis de anfotericina B poliagregada durante el resto del tratamiento para eliminar la infección sin producir tantos daños renales.

Cuando se utiliza sólo una dosis de 10 mg/kg de una formulación de anfotericina B y desoxicolato sódico en proporción 1:1,5, combinada con tres dosis de 3 mg/kg de anfotericina B y desoxicolato de sodio en proporción 1:0,8, se observa que al final del estudio el 60% de los animales presentó colonización renal por *C. albicans* por lo que el tratamiento ha resultado ser insuficiente. Así mismo, los parámetros bioquímicos de creatinina, AST y ALT de este grupo fueron elevados aunque disminuyeron a lo largo del tratamiento y fueron inferiores a los presentados por los animales tratados con Fungizona[®]. Sin embargo, es de destacar que la hepatotoxicidad en este caso debe atribuirse en mayor medida a la infección ya que los valores de las enzimas AST y ALT fueron mayores que las presentadas por el grupo tratado con cuatro dosis elevadas de anfotericina B poliagregada (AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg).

El tratamiento con dos dosis de choque iniciales de anfotericina B poliagregada (AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg) seguida de dos dosis inferiores (AMB:DCH 1:0,8 a 3 mg/kg) erradicó la candidiasis tanto a nivel renal como cerebral y sus valores de creatinina fueron mejores que los observados en el tratamiento de cuatro dosis elevadas de anfotericina B poliagregada. In embargo los valores de AST y ALT fueron ligeramente mayores que los observados en el tratamiento de cuatro dosis elevadas de anfotericina B poliagregada lo que induce a pensar que estos valores de hepatotoxicidad deben atribuirse a la candidiasis. En cualquier caso, este tratamiento indujo una menor toxicidad renal y hepática que la observada en el grupo tratado con Fungizona[®] y lo que es mas importante erradicó la candidiasis a nivel renal lo que no se logró con el tratamiento con la formulación comercial de Fungizona[®]. Este tratamiento presenta la ventaja frente al tratamiento de cuatro dosis de la

formulación AMB:DCH 1:1,5 (10 mg/kg) de tener una menor toxicidad local en la zona de inyección.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- Adler-Moore JP, Olson JA y Proffitt RT. 2004. "Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (AmBisome) effective in treating murine systemic candidiasis". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54:1096-1102.
- Ellis M. 2008. "New dosing strategies for liposomal amphotericin B in high-risk patients". *Clinical Microbiology and Infection* 14:55-64.
- Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP y Torrado JJ. 2008a. "Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations". *International Journal of Pharmaceutics* 361:64-69.
- Espada R, Valdespina S, Molero G, Dea MA, Ballesteros MP y Torrado JJ. 2008b. "Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B". *International Journal of Antimicrobial Agents* 32:55-61.
- van Etten EWM, Snijders SV, van Vianen W y Bakker-Woudenberg IAJM. 1998. "Superior efficacy of liposomal amphotericin B with prolonged circulation in blood in the treatment of severe candidiasis in leukopenic mice". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:2431-2433.
- Fielding RM, Singer AW, Wang LH, Barbar S y Guo LSS. 1992. "Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:299-307.

- Gondal JA, Swartz RP y Rahman A. 1989. "Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33:1544-1548.
- Gubbins PO, Amsden JR, McConnell SA. y Anaissie EJ. 2009. "Pharmacokinetics and buccal mucosal concentrations of a 15 milligram per kilogram of body weight total dose of liposomal amphotericin B administered as a single dose (15 mg/Kg), weekly dose (7.5 mg/Kg), or a daily dose (1 mg/kg) in a peripheral stem cell transplant patients" *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 53: 3664-74.
- Huang W, Zhang Z, Han X, Tang J, Wang J, Dong S y Wang E. 2002. "Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy". *Biophysical Journal* 83:3245-3255.
- Khan MA y Owais M. 2006. "Toxicity, stability and pharmacokinetics of amphotericin B in immunomodulator tuftsin-bearing liposomes in a murine model". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58:125-132.
- Larabi M, Pages N, Pons F, Appel M, Gulik A, Schlatter J, Bouvet S y Barratt G. 2004. "Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:81-88.
- Olson JA, Adler-Moore JP, Jensen GM, Schwartz J, Dignani MC y Proffitt RT. 2008. "Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:259-268.

- Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP y Torrado S-S. 2008. "Amphotericin B formulations and drug targeting". *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:2405-2425.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1- Los estudios espectrofotométricos demuestran que la anfotericina B incluida en las nuevas formulaciones que contienen distintas proporciones de desoxicolato de sodio se encuentra mayoritariamente en un estado poliagregado. El tamaño de partícula de estos poliagregados sigue una distribución bimodal con una fracción mayoritaria con tamaños entre 734 y 334 nm. Las formulaciones AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 son las que presentan menores poblaciones de partículas de gran tamaño (>4300 nm).

2- Las nuevas formulaciones de poliagregados de anfotericina B y desoxicolato de sodio alcanzan concentraciones de anfotericina B similares al AmBisome[®] en hígado y bazo cuando se administran a dosis de 5 mg/Kg, mientras que a nivel renal se obtienen concentraciones del orden de 3 veces superiores. Estas elevadas concentraciones en los órganos diana de las infecciones por *Cándida albicans* serán especialmente importantes para su erradicación.

3- Cuando las dosis de anfotericina B administradas son 4 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria el efecto postantifúngico es igual o superior a 24 h en todas las nuevas formulaciones que contienen desoxicolato de sodio lo que puede ayudar a evitar reinfecciones en los tratamientos que se administran cada 24 h.

4- La nueva formulación con proporciones anfotericina B: desoxicolato de sodio 1:1,5 presenta menor efecto hemolítico que las formulaciones comerciales AmBisome[®] y Fungizona[®]. Proporciones de este tensioactivo iguales o superiores a 2 aumentan excesivamente el efecto hemolítico.

CONCLUSIONES

5- Los tiempos medios de supervivencia obtenidos tras la administración de una dosis única de 3 mg/kg de las formulaciones AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5 fueron mayores que los obtenidos con la formulación comercial Fungizona[®] tras una dosis de 1 mg/kg de anfotericina B. La administración de las nuevas formulaciones a una dosis de 5 mg/kg consigue tiempos medios de supervivencia similares a los obtenidos tras la administración de la formulación comercial AmBisome[®] a la misma dosis.

6- La administración de dosis múltiples de las nuevas formulaciones (AMB:DCH 1:0,8 y AMB:DCH 1:1,5) demuestra que el tratamiento de cuatro semanas con dosis de 5 mg/kg/semana consigue erradicar la infección cerebral en todos los animales analizados. Así mismo, los niveles de colonización renal disminuyen en al menos una unidad logarítmica al final del estudio en los animales infectados frente al mismo tratamiento con dosis menores (3 mg/kg/semana), mientras que los valores de creatinina sérica no se encuentran alterados.

7- A medida que aumenta la proporción de desoxicolato de sodio en las formulaciones aumenta el porcentaje de animales que presentan una erradicación total de la infección a nivel renal, pasando de un 20% a un 43% para las proporciones de 0,8 y 1,5 respectivamente, tras la administración de dosis múltiples de 5 mg/kg/semana.

8- El tratamiento con dosis elevadas durante las cuatro semanas de anfotericina B poliagregada (AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg/semana) ha demostrado ser eficaz para erradicar la infección tanto a nivel renal como cerebral y los niveles de creatinina fueron inferiores a los que presentaron los animales tratados con Fungizona[®] con dosis de 1 mg/kg/semana aunque los animales presentaron necrosis local en el punto de inyección.

9- El tratamiento con dos dosis de choque iniciales de anfotericina B poliagregada (AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg/semana) seguida de dos dosis inferiores (AMB:DCH 1:0,8 a 3 mg/kg/semana) presenta menor necrosis local en el punto de inyección que el tratamiento de cuatro dosis semanales de AMB:DCH 1:1,5 a 10 mg/kg/semana. Iguala los valores de AST y ALT que se obtienen con la formulación comercial AmBisome[®] (5 mg/kg/semana) y se obtiene un nivel de creatinina similar al del grupo control. Este tratamiento erradica la candidiasis tanto a nivel renal como cerebral.

