



Universitat Autònoma
de Barcelona

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**“EFICACIA TERAPÉUTICA DE
DIFERENTES REGÍMENES DE
ADMINISTRACIÓN DE LA ANFOTERICINA
B LIPOSOMAL EN UN MODELO ANIMAL
EXPERIMENTAL DE ASPERGILOSIS
PULMONAR INVASORA”**

TESIS DOCTORAL
presentada por
M^a TERESA MARTÍN GÓMEZ
para optar al título de
DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA.

Directores:
Dr. ALBERT PAHISSA I BERGA
Dr. JOAN GAVALDÀ I SANTAPAU

BARCELONA, 2007

Índice	i
Agradecimientos	iv
Abreviaturas	vii
1.- Introducción	1
1.1.- La aspergilosis invasora en la práctica clínica	2
1.2.- Epidemiología de la aspergilosis invasora	3
1.3.- El género <i>Aspergillus</i> . Aspectos micológicos	4
1.4.- Factores de patogenicidad de <i>A. fumigatus</i>	5
1.5.- Mecanismos de defensa del hospedador frente a <i>A. fumigatus</i>	7
1.6.- Papel de la inmunosupresión en el desarrollo de la aspergilosis pulmonar invasora. Los glucocorticoides como factor de riesgo para la infección por <i>Aspergillus</i>	7
1.7.- Patología ocasionada por los hongos del género <i>Aspergillus</i>	10
1.7.1.- Generalidades	10
1.7.2.- Presentación y principales características clínicas de la infección respiratoria ocasionada por <i>Aspergillus</i> en función del tipo de paciente	12
1.7.3.- Características clínicas de la aspergilosis pulmonar invasora	14
1.7.3.1.- Aspergilosis pulmonar invasora aguda	14
1.7.3.2.- Aspergilosis pulmonar invasora crónica	16
1.8.- Tratamiento de la aspergilosis invasora	17
1.8.1.- Generalidades	17
1.8.2.- Polienos: la anfotericina B	18
1.8.2.1.- Anfotericina B deoxicolato	18
1.8.2.2.- Formulaciones lipídicas de anfotericina B. Generalidades	20
1.8.2.3.- Anfotericina B liposomal	22
1.9.- Nuevas estrategias de administración de la anfotericina B liposomal. Fundamentos y perspectivas terapéuticas	24
1.9.1.- Administración de dosis altas de anfotericina B liposomal	25
1.9.2.- Administración de dosis de carga de anfotericina B liposomal	26
1.9.3.- Administración nebulizada de anfotericina B liposomal	28
1.10.- Los modelos animales de infección y su papel en la evaluación de los antimicrobianos	29
1.11.- El modelo animal de aspergilosis pulmonar invasora	30
1.11.1.- Importancia del modelo animal en el estudio de la	

aspergilosis pulmonar invasora	30
1.11.2.-Generalidades sobre los modelos animales de aspergilosis invasora y sus principales características	31
1.12.- Modelo de aspergilosis pulmonar experimental utilizado en el presente estudio	33
1.12.1.-Características	33
1.12.2.-Vías de administración de los antifúngicos utilizadas en el estudio actual	34
1.12.3.-Ventajas y limitaciones del modelo	36
1.13.- Evaluación de la eficacia terapéutica en los modelos animales de aspergilosis pulmonar invasora	37
1.13.1.-Generalidades	37
1.13.2.-Estimación de la biomasa fúngica en los tejidos animales	38
1.13.2.1.- Recuento de unidades formadoras de colonias	38
1.13.2.2.- Cuantificación de quitina	38
2.- Publicaciones	41
2.1.- Objetivos generales	42
2.2.- Objetivos concretos	42
2.2.1.- Objetivos concretos del estudio 1	42
2.2.2.- Objetivos concretos del estudio 2	43
2.2.3.- Objetivos concretos del estudio 3	43
2.3.- Estudio 1	44
2.3.1.- Hipótesis de trabajo del estudio 1	45
2.3.2.- Objetivos concretos del estudio 1	45
2.3.3.- Publicación 1	46
2.4.- Estudio 2	49
2.4.1.- Hipótesis de trabajo del estudio 2	50
2.4.2.- Objetivos concretos del estudio 2	51
2.4.3.- Publicación 2	52
2.5.- Estudio 3	58
2.5.1.- Hipótesis de trabajo del estudio 3	59
2.5.2.- Objetivos concretos del estudio 3	59
2.5.3.- Publicación 3	60
3.- Resultados	63
3.1.- Resultados del estudio 1	64
3.2.- Resultados del estudio 2	67
3.3.- Resultados del estudio 3	70
4.- Discusión	73

4.1.-	Discusión del estudio 1	74
4.2.-	Discusión del estudio 2	77
4.3.-	Discusión del estudio 3	80
5.-	Conclusiones	84
6.-	Bibliografía	86

Abreviaturas.

ABC	Area Bajo la Curva de concentración-tiempo.
°C	Grados centígrados.
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima.
C _{max}	Concentración plasmática máxima.
d-AMB	Anfotericina B deoxicolato.
EORTC	Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (de “ <i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i> ”).
IL	Interleukina.
i.v.	intravenoso.
L-AMB	Anfotericina B liposomal.
L/kg	Litros por kilogramo.
LD ₅₀	Dosis Letal 50 (de “ <i>Lethal dose 50</i> ”).
log ₁₀	Logaritmo decimal.
mg/kg	Miligramos por kilogramo.
mg/kg/día	Miligramos por kilogramo de peso y día.
Nº	Número
nd-AMB	Anfotericina B deoxicolato nebulizada.
nL-AMB	Anfotericina B liposomal nebulizada.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (de “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”).
RESITRA	Red de Estudio de la Infección en el Transplante.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
TAC	Tomografía Axial Computerizada.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
α-TNF	Factor de Necrosis Tumoral alfa (de “ <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> ”).
µg/mL	Microgramos por mililitro.
µg/g	Microgramos por gramo.
µm	Micrometro.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ASPERGILOSIS INVASORA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

La incidencia y la prevalencia de las infecciones fúngicas invasoras han crecido en los últimos años de forma paralela al aumento de la población inmucomprometida. La patología oncológica, los trasplantes, ya sea de órgano sólido o de precursores hematopoyéticos, o la administración crónica de corticoesteroides, entre otros, hacen a los pacientes más vulnerables a las infecciones fúngicas (1). Entre éstas, la aspergilosis es la infección invasora por hongos filamentosos oportunistas más frecuente (2).

El incremento progresivo del número de pacientes expuestos al riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora está directamente relacionado con factores como el desarrollo de nuevos y más intensos regímenes quimioterápicos para el tratamiento de las neoplasias, los avances médicos que han propiciado la generalización de los trasplantes o la ampliación de las indicaciones de los tratamientos inmunosupresores (1-6). Por otra parte, las mejoras conseguidas en las estrategias de prevención, que han repercutido en una considerable reducción de las infecciones bacterianas en estos pacientes, también han contribuido a incrementar la incidencia de la aspergilosis invasora. Como consecuencia de todo lo anterior, la aspergilosis invasora se ha convertido en una de las principales causas directas o indirectas de muerte en pacientes leucémicos sometidos al tratamiento de su enfermedad de base o en pacientes receptores de trasplantes, tanto de precursores hematopoyéticos como de órganos sólidos (2).

Hasta fechas muy recientes el arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de las infecciones invasoras por hongos filamentosos oportunistas se encontraba extraordinariamente limitado, de

manera que únicamente se disponía de un polieno, la anfotericina B, un azol, el itraconazol y a un análogo de nucleósido, la 5-flucitosina. Recientemente se han comercializado dos nuevos antifúngicos triazólicos, el voriconazol y el posaconazol, y una equinocandina, la caspofungina.

La identificación de los principales factores de riesgo para la aspergilosis invasora o las mejoras en las técnicas diagnósticas que se han producido en los últimos años han supuesto un notable avance a la hora de hacer frente a esta infección. A pesar de todo, esta enfermedad sigue registrando índices de mortalidad inaceptablemente elevados con las pautas de tratamiento actualmente recomendadas (7). Es imprescindible, por tanto, lograr un aumento en la eficacia de los tratamientos utilizados para combatir esta infección y para ello se hacen necesarios bien la aparición de nuevos antifúngicos, lo que representa un proceso largo y complejo, bien el desarrollo de nuevas estrategias de uso terapéutico de los fármacos que ya se encuentran disponibles en la práctica clínica.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ASPERGILOSIS INVASORA.

Aunque la exposición a esporas de *Aspergillus* es habitual en la población general, los individuos con mecanismos de defensa inmunitaria pulmonar conservados raramente desarrollan una infección, mientras que aquellos que presentan alteraciones inmunitarias son más sensibles a este hongo (8). En un estudio realizado en 23 centros de E.E.U.U. y 1 de Canadá sobre 1209 pacientes en los que se aisló *Aspergillus* se identificaron las enfermedades pulmonares, el uso de corticoesteroides y la diabetes mellitus como las tres situaciones clínicas más importantes que incrementaban el riesgo de colonización por *Aspergillus* (9)

En lo que respecta a la infección invasora por *Aspergillus*, los datos recogidos en nuestro país por la Red de Estudio de la Infección en el Trasplante (RESITRA) reflejan que en el periodo comprendido entre Septiembre de 2003 y Febrero de 2005 se diagnosticaron por cada 100 trasplantes de progenitores hematopoyéticos 3.8 episodios de aspergilosis invasora probada o probable según los criterios de la European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (10), lo que representó el 56.8% de las infecciones fúngicas no candidiásicas en este grupo de pacientes (11). De los datos recopilados por RESITRA también se desprende que las infecciones invasoras por *Aspergillus* spp. afectan al 3.9% de los receptores de trasplante pulmonar, al 1.7% de los receptores de trasplante de páncreas o al 0.8% de los receptores de trasplante hepático (12).

La mortalidad de los pacientes neutropénicos afectados por infecciones fúngicas es elevada. En los pacientes receptores de trasplante de médula ósea con enfermedad diseminada o proceso neumónico el índice de mortalidad de las infecciones por *Aspergillus* puede superar incluso el 90% (13-16). Entre los receptores de trasplante de órgano sólido, el estudio RESITRA ha registrado un índice global de fracaso terapéutico del 43% (12). Asimismo, en la literatura se encuentra descrito que en pacientes con lupus eritematoso sistémico, sometidos a tratamientos crónicos con corticoesteroides, la aspergilosis invasora es una causa frecuente de morbi-mortalidad, con un índice de mortalidad que puede alcanzar el 15% (17)

1.3. EL GÉNERO *Aspergillus*. ASPECTOS MICOLÓGICOS.

Los hongos del género *Aspergillus* son ascomicetos pertenecientes a la clase de los Plectomycetos, orden Eurotiales, familia Trichocomaceae (18) Las especies que con más frecuencia causan enfermedad invasora son *A. fumigatus* (responsable de aproximadamente el 90% de los casos), *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*, que son capaces de crecer a 35-37°C, aunque puntualmente se han descritos casos atribuidos a otras especies como *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulatus*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Neosartorya fisherii* y otros (2).

Se cree que la materia vegetal en descomposición es el nicho ecológico primario de *A. fumigatus*, una de las especies más ubicuas de entre las que se propagan por vía aérea (19, 20). *A. fumigatus* esporula abundantemente, liberando al aire esporas de un tamaño lo suficientemente pequeño, 2-3 μm , como para alcanzar los alveolos pulmonares. Algunos estudios ambientales indican que el ser humano llega a inhalar varios cientos de conidias de *A. fumigatus* diariamente y se cree que ésta es la razón por la que la mayoría de los pacientes presenta una enfermedad predominantemente pulmonar (20). El desarrollo de una aspergilosis invasora se producirá, no obstante, sólo cuando un hospedador susceptible se haya expuesto a un inóculo relevante; la cuantía de este inóculo parece depender de cada hospedador.

1.4. FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *A. fumigatus*.

Se han descrito numerosas propiedades y factores de virulencia de *A. fumigatus* que podrían estar relacionados con su capacidad patógena. Entre ellos se encuentra su capacidad para crecer a 37°C, su velocidad de crecimiento, el pequeño tamaño de sus

esporas (lo que les permitiría una penetración profunda en el pulmón) (2) o la capacidad de *A. fumigatus* para unirse de forma más eficiente que otras especies a proteínas como la laminina (21) o el fibrinógeno (22, 23), lo que podría facilitar una mejor adhesión del hongo a la vía aérea antes de iniciar la invasión tisular. También se ha apuntado algún tipo de relación entre la patogenicidad de este hongo y algunos componentes de su pared celular como el $\beta(1-3)$ -glucano, el galactomanano, las galactomanoproteínas y las enzimas quitina sintetasas entre otras (24). Algunas moléculas parecen estar implicadas en la evasión del hongo de la respuesta inmune del hospedador, como la capa “rodlets” y la melanina-DHL de las conidias. Con frecuencia también se han apuntado como esenciales para su virulencia las catalasas y las superóxidodismutasas, que actúan como sistemas de detoxificación de los compuestos derivados del oxígeno producidos por los fagocitos del hospedador. Asimismo, el hongo produce diversas toxinas (sustancia difusible de las conidias de 14 kDA, fumigaclavina C, aurasperona C, gliotoxina, ácido helvólico, fumagilina, Asp-hemolisina y la ribotoxina Asp fl/mitogilina F/restrictocina), alérgenos (Asp f1 y Asp f23) y enzimas (serina proteasas alcalinas, metaloproteasas, dipeptidilpeptidasas, aspárticoproteasas y fosfolipasas B y C) (2, 19, 23-25). También parecen estar relacionadas con su patogenicidad diversas capacidades y reacciones metabólicas de *A. fumigatus*, como la obtención de hierro mediante sideróforos de tipo hidroxamato, la obtención de fósforo o las cascadas de transducción de señales que regulan la morfogénesis y la utilización de nutrientes como el nitrógeno entre otras (24).

1.5. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR FRENTE A

A. fumigatus.

La inmunidad natural o inespecífica juega un papel esencial en la defensa del huésped frente a *A. fumigatus*, reconociendo y eliminando al hongo en el individuo inmunocompetente. La primera línea de defensa del sistema inmune frente a la infección por *Aspergillus* en el pulmón, y probablemente en las fosas nasales, está constituida por los macrófagos, capaces de fagocitar y destruir las conidias inhaladas mediante mecanismos no oxidativos (26). Los macrófagos son células con una elevada capacidad fagocítica, siendo capaces de fagocitar más de 10^8 conidias al día (20). Aún así, algunas conidias escapan a la fagocitosis y pueden germinar y dar lugar a hifas, pudiendo ser el origen de una infección invasora. En ese caso, los neutrófilos son atraídos por quimiotaxis y, una vez unidos a las hifas, los leucocitos polimorfonucleares las destruyen mediante mecanismos citotóxicos oxidativos (20, 27). Aunque las hifas son esencialmente destruidas por los neutrófilos también participan en este proceso, en menor medida, los monocitos (28) y, posiblemente, los macrófagos.

1.6. PAPEL DE LA INMUNOSUPRESIÓN EN EL DESARROLLO DE LA ASPERGILOSIS PULMONAR INVASORA. LOS GLUCOCORTICOIDES COMO FACTOR DE RIESGO PARA LA INFECCIÓN POR *Aspergillus.*

La regulación a la baja del sistema inmune favorece el desarrollo de la aspergilosis invasora aunque la respuesta histológica a la infección varía, según el grado y tipo de déficit inmunológico, desde una respuesta granulomatosa florida a una baja carga fúngica

hasta una respuesta tisular mínima alrededor de una amplia zona de necrosis invadida por una densa red de hifas (2). Por ello, la disfunción de los neutrófilos (típicos del SIDA o la enfermedad granulomatosa crónica) y la neutropenia, se traducen en el desarrollo de diferentes tipos de aspergilosis invasora.

Los glucocorticoides, que se encuentran entre los principales factores de riesgo para la aspergilosis invasora, juegan un papel fundamental en la progresión de la infección ya que son responsables de un efecto inmunosupresor extenso y complejo tanto cualitativo como cuantitativo. Son capaces de afectar a prácticamente cualquier tipo de célula que participe en la inmunidad y la respuesta inflamatoria (29-31) y alteran tanto a la función de los macrófagos, responsables de la eliminación de las conidias, como a la actividad de aclaramiento de las hifas por los neutrófilos y los monocitos (32, 33) Entre otros muchos efectos, se ha descrito que producen en los neutrófilos el deterioro de la función fagocítica, la degranulación y el daño oxidativo, la disminución de la producción de citoquinas y óxido nítrico y una deficiencia en su capacidad de adhesión al endotelio, de extravasación y quimiotaxis y de inhibición de la apoptosis (lo que resulta en una supervivencia prolongada de los neutrófilos con disfunciones). En cuanto a los monocitos y los macrófagos, los glucocorticoides producen una monocitopenia reversible superior incluso al 40%, así como el deterioro de la función fagocítica y del daño oxidativo, la reducción de la quimiotaxis y la migración a los focos de inflamación de estas células, la inhibición de la maduración de los monocitos a macrófagos o la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias o de óxido nítrico (34).

Los macrófagos expuestos a concentraciones farmacológicas de glucocorticoides fagocitan las conidias a velocidad normal y

responden adecuadamente en lo que respecta a la liberación de metabolitos respiratorios y radicales de oxígeno, pero pierden su capacidad para impedir la germinación de las conidias y para destruirlas (35, 36). Se cree que este efecto podría ser debido a la capacidad de los glucocorticoides de estabilizar las membranas de los lisosomas y de impedir la fusión de los fagolisosomas durante la fagocitosis de *A. fumigatus* (37, 38).

Además de la disfunción inmunológica, los glucocorticoides pueden inducir cambios en la biología de *Aspergillus*. Se ha descrito que la exposición de algunas especies de *Aspergillus*, como *A. flavus* o *A. fumigatus* a concentraciones fisiológicas de corticoides aumenta el crecimiento *in vitro* del hongo, lo que podría contribuir a potenciar su capacidad para causar infección (39).

La administración sistémica de glucocorticoides está muy extendida y su uso es habitual en los casos de trasplante de progenitores hematopoyéticos y de órgano sólido, en el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas como la leucemia, el linfoma o el mieloma múltiple, o en el tratamiento de determinados trastornos reumatológicos (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico) o pulmonares crónicos (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sarcoidosis). Como ya se ha mencionado, el efecto inmunosupresor que los glucocorticoides ejercen principalmente sobre los macrófagos, pero también sobre los leucocitos polimorfonucleares, es responsable de que los pacientes que reciben este tipo de fármacos estén expuestos a un elevado riesgo de padecer una infección fúngica invasora (34). Es más, la aspergilosis invasora es la infección invasora por hongos filamentosos que se asocia con más frecuencia al tratamiento con glucocorticoides (2, 20). El tipo de infección fúngica invasora que pueden desarrollar los pacientes, no obstante, parece depender

tanto de la intensidad del tratamiento con glucocorticoides como de la virulencia del hongo responsable de la infección.

De los datos recogidos en la literatura parece desprenderse que el empleo de dosis altas de esteroides junto a su administración sistémica prolongada están relacionadas con un riesgo elevado y un peor pronóstico de las infecciones fúngicas invasoras (15, 40). En este sentido, se ha descrito que el excesivo acúmulo de glucocorticoides administrados como profilaxis o tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante alogénico de médula ósea está asociado a un aumento del riesgo tanto de presentar una aspergilosis invasora como de que ésta evolucione de forma desfavorable (40, 41).

1.7. PATOLOGÍA OCACIONADA POR LOS HONGOS DEL GÉNERO *Aspergillus*.

1.7.1. GENERALIDADES

La patología producida por las diversas especies de *Aspergillus* se pueden clasificar en tres grandes grupos (42).

Dentro del primer grupo quedan englobadas las aspergilosis respiratorias de causa inmunoalérgica, es decir, el asma aspergilar, la broncoalveolitis alérgica extrínseca y la aspergilosis broncopulmonar alérgica o bronquitis aspergilar mucomembranosa en la que las conidias, además de actuar como alérgenos, producen una infección localizada.

El segundo grupo de entidades nosológicas incluiría las aspergilosis por colonización. Aquí se encontrarían clasificados el aspergiloma y la aspergilosis del conducto auditivo y los senos paranasales. En el caso del aspergiloma las conidias inhaladas de

Aspergillus llegan hasta cavidades pulmonares comunicadas con la luz bronquial que se han formado en el curso de una enfermedad previa y allí germinan originando una masa de micelio intracavitario que no invade el parénquima normal adyacente. Tampoco se produce invasión tisular en la otomicosis o la aspergilosis sinusal.

El tercer gran grupo de infecciones aspergilaes lo constituyen las formas invasoras de la aspergilosis. Aunque la mayoría de los pacientes neutropénicos afectados por una infección aspergilar invasora presentan enfermedad pulmonar (80-90%), el espectro clínico de la aspergilosis invasora es muy amplio y varía en función de la patología de base de los pacientes (2). Así, podemos distinguir entre las infecciones que se producen en un contexto de daño tisular y aquellas que se presentan en hospedadores inmunocomprometidos:

(i) Entre las infecciones asociadas al daño de un tejido, a una intervención quirúrgica o a la presencia de un cuerpo extraño en el organismo estarían incluidas la queratitis y la endocarditis fúngica, la infección cutánea sobre una lesión previa quirúrgica o accidental, la infección de zonas anatómicas sometidas a cirugía (endocarditis de válvula protésica o empiema subdural) y la infección asociada a la presencia de un cuerpo extraño (catéteres venosos centrales o de diálisis peritoneal continua ambulatoria).

(ii) Las infecciones invasoras por *Aspergillus* que se presentan en los hospedadores inmunocomprometidos comprenden la aspergilosis cutánea primaria, una forma de presentación localizada pero que puede diseminarse y que afecta sobre todo a niños leucémicos; la aspergilosis pulmonar en sus formas invasora aguda y crónica necrosante, esta última propia de

pacientes con disfunciones de la inmunidad celular; la aspergilosis de la vía aérea, casi exclusiva de los pacientes receptores de un trasplante pulmonar; la rinosinusitis por *Aspergillus* y, por último, la aspergilosis diseminada, que es la que afecta a cualquier órgano de la economía después de que el hongo invada los vasos sanguíneos del foco primario de infección (2).

1.7.2. PRESENTACIÓN Y PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN RESPIRATORIA OCASIONADA POR *Aspergillus* EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PACIENTE.

La afectación pulmonar es la más frecuente entre los pacientes diagnosticados de aspergilosis invasora. Una serie recientemente publicada reveló que el 56% de los pacientes presentaba una infección restringida a los pulmones (43).

En lo concerniente a los aspectos puramente clínicos de la infección, el espectro de manifestaciones de la enfermedad pulmonar es muy amplio ya que la patología de base de los pacientes no sólo condiciona el tipo de presentación clínica, sino también la progresión de la enfermedad (43). Así, mientras que los pacientes más inmunocomprometidos presentan muy escasa sintomatología y una rápida progresión de la infección, los pacientes con un sistema inmune más conservado tienden a manifestar síntomas insidiosos y lentamente progresivos (2, 42).

En los pacientes con enfermedades hematológicas malignas aproximadamente un 75% de las infecciones por *Aspergillus* se producen durante la quimioterapia de inducción y se caracterizan por presentar un elevado riesgo de hemorragia fatal en el caso de lesiones situadas próximas al hilio pulmonar (2, 42).

En los receptores de trasplante alogénico de médula ósea o de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, particularmente en los procedentes de donantes no relacionados, la infección suele ser bilateral, difusa y de pronóstico fatal. Habitualmente se manifiesta de forma tardía, como media a los 3 meses del injerto, sobre todo en aquellos pacientes que desarrollan una enfermedad de injerto contra huésped de grado II/III (2, 42).

En los receptores de trasplante de órgano sólido el momento en que se presenta la infección es variable y sus principales características dependen del tipo de trasplante. Así, en el caso de los receptores de trasplante pulmonar es difícil distinguir entre la colonización de la vía aérea y la enfermedad invasora; la manifestación de la infección como traqueobronquitis invasora o aspergilosis bronquial invasora, que es la de mejor pronóstico, es casi exclusiva de estos pacientes. En los receptores de trasplante cardíaco o renal la infección se suele presentar en forma de nódulos pulmonares de aparición tardía y curso indolente con buen pronóstico si se diagnostica a tiempo. En los receptores de trasplante hepático, en cambio, la forma de aspergilosis invasora más común es la neumonía, que disemina rápidamente y tiene una mortalidad superior al 80% (2, 42).

Antes de la era de los modernos tratamientos con antirretrovirales, en los pacientes infectados por el VIH o con SIDA en fase avanzada, a menudo con neutropenia y/o tratamiento con corticoesteroides, solía observarse la infección aspergilar en la vía aérea y las cavidades de los lóbulos superiores. Su presentación, subaguda, era difícil de distinguir de otras infecciones y hasta en un 25% de los casos desembocaba en una hemoptisis fatal (2, 42).

En los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, la aspergilosis pulmonar puede presentarse en cualquier momento de la vida y habitualmente se manifiesta como abscesos fríos de progresión lenta (2, 42).

1.7.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ASPERGILOSIS PULMONAR INVASORA.

1.7.3.1. Aspergilosis pulmonar invasora aguda.

La aspergilosis pulmonar aguda es la forma clínica más habitual de aspergilosis invasora. Las formas anatomo-clínicas más frecuentes de la aspergilosis pulmonar aguda son el infarto hemorrágico y la bronconeumonía necrosante. Otras formas clínicas como los abscesos pulmonares únicos o múltiples o la neumonía lobular son menos frecuentes (44, 45).

El 25-30% de los pacientes no manifiestan inicialmente síntomas atribuibles a una aspergilosis pulmonar invasora y sólo los desarrollan a medida que la infección progresa. Los síntomas más tempranos incluyen la tos, habitualmente seca, y la fiebre. Los pacientes tratados con corticoesteroides a menudo están afebriles y no presentan más que un dolor pleurítico de baja intensidad, a menudo sordo e inespecífico. Aunque puede haber hemoptisis, es raro que aparezca como síntoma inicial. En los casos de enfermedad difusa suele haber disnea e hipoxemia y, en algunos pacientes, la infección debuta simulando un embolismo pulmonar. En pacientes neutropénicos, es típico encontrar un dolor torácico agudo acompañado de disnea y en ocasiones, la aspergilosis pulmonar aguda se puede presentar como un neumotórax espontáneo. En cualquier caso, las manifestaciones clínicas de la forma pulmonar aguda de la infección aspergilar son

indistinguibles de las ocasionadas por otros hongos filamentosos como los zigomicetos (2, 42).

El pronóstico de la infección focal, en particular de las formas nodulares, es mucho más favorable que el de las formas difusas y bilaterales, ya que la infección localizada tiende a progresar más lentamente (46-48) aunque presenta el riesgo de desembocar en una hemoptisis súbita potencialmente mortal (48, 49).

Las imágenes que ofrece la aspergilosis invasora en la radiografía simple de tórax son muy heterogéneas y aunque en un contexto apropiado sean altamente sugerentes de una infección por *Aspergillus*, ninguna es patognomónica de la aspergilosis pulmonar invasora (2). Las más típicas son las cavitaciones y las lesiones en forma de cuña con base en la pleura, así como los nódulos cavitados o no, y las consolidaciones alveolares que van convergiendo a lo largo del tiempo hasta formar pequeños nódulos. También es posible observar condensaciones leves y difusas que suelen afectar a los lóbulos inferiores. Las imágenes correspondientes a derrames pleurales, en cambio, son poco habituales.

A menudo, en el curso de una aspergilosis pulmonar invasora rápidamente progresiva, la radiología simple de tórax no ofrece ninguna información, por lo que se hace necesario recurrir a técnicas de imagen más sofisticadas como la tomografía axial computerizada (TAC), que juega un importante papel en el diagnóstico precoz (47, 50-54). En los pacientes neutropénicos, las lesiones tempranas más características son los pequeños nódulos y las pequeñas lesiones con base en la pleura de bordes rectos y rodeados por una zona de señal atenuada (“signo del halo”). A medida que la enfermedad progresa, los nódulos se cavitan,

muchas veces coincidiendo con la recuperación de los recuentos de neutrófilos, dando paso al “signo de la media luna”. Ambos signos, aunque muy sugerentes de la infección pulmonar que a menudo causa *Aspergillus* spp., no son específicos, ya que también pueden observarse en infecciones pulmonares por mucorales y otros hialohifomicetos (42, 55).

1.7.3.2. Aspergilosis pulmonar invasora crónica.

Menos común que la forma aguda, puede verse en pacientes con SIDA, enfermedad granulomatosa crónica, diabetes mellitus, alcoholismo o en pacientes sometidos a un tratamiento prolongado con corticoesteroides por una enfermedad pulmonar crónica (56-58). Estos pacientes presentan alteraciones en los mecanismos de defensa inmunitarios leves a moderados y, previamente, pueden estar sanos o pueden padecer alguna patología pulmonar como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la sarcoidosis, la tuberculosis residual, la neumoconiosis o la fibrosis post-radiación. En los pacientes afectados de aspergilosis pulmonar crónica invasora relativamente inmunocompetentes, el cuadro clínico tiende a ser más florido, suele durar semanas o meses e incluye tos crónica productiva, expectoración hemoptoica y, con frecuencia, fiebre moderada, astenia y pérdida de peso. En sus manifestaciones clínicas la neumonía crónica necrotizante aspergilar se asemeja a un aspergiloma, entidad con la que se debe hacer un diagnóstico diferencial. En la radiografía de tórax se observa un área de consolidación alveolar cavitada en una zona donde previamente no existía ninguna cavitación y para realizar un diagnóstico de certeza es imprescindible la demostración de hifas en el tejido junto con un cultivo de secreción respiratoria positivo al hongo (2).

1.8. TRATAMIENTO DE LA ASPERGILOSIS INVASORA.

1.8.1. GENERALIDADES.

Aunque la mortalidad global de la aspergilosis invasora es elevada, varía en función de la forma clínica y del tipo de paciente. Así, las tasas de mortalidad son particularmente altas incluso a pesar del tratamiento en pacientes de alto riesgo (neoplasias hematológicas, trasplantados) o en formas como la aspergilosis cerebral (59).

Entre los fármacos antifúngicos actualmente disponibles para la profilaxis o el tratamiento de las infecciones invasoras causadas por hongos filamentosos se encuentran los polienos, particularmente la anfotericina B, los triazoles, como el itraconazol, el voriconazol o el posaconazol, las pirimidinas como la 5-fluorocitosina, y las equinocandinas como la caspofungina. De ellos, sólo las diferentes formulaciones de anfotericina B, el itraconazol, el voriconazol, el posaconazol y la caspofungina se encuentran aprobados en Europa para su uso en el tratamiento de la aspergilosis invasora (60).

Las recomendaciones terapéuticas actualmente aceptadas se encuentran reflejadas en diversas publicaciones recientes y son el fruto de la revisión crítica de la literatura por parte de comités multidisciplinares de expertos (60-62). Desafortunadamente, las tasas de respuesta favorable que consigue con ellos son bajas (7). Varios estudios recientemente publicados cifran en aproximadamente un 40-65 % el índice de éxito obtenido en el tratamiento con las pautas actualmente recomendadas de anfotericina B liposomal, voriconazol o caspofungina, los antifúngicos comercializados más recientemente (63-66).

1.8.2. POLIENOS: ANFOTERICINA B.

La anfotericina B es un polieno macrólido originalmente obtenido a partir de una cepa de *Streptomyces nodosus* aislada de una muestra de tierra tomada por Gold y colaboradores en Tembladora, Venezuela, cerca del río Orinoco en 1955 (67). Se considera uno de los antifúngicos con más amplio espectro de entre los disponibles actualmente y es el pilar fundamental del tratamiento de muchas infecciones fúngicas invasoras (68, 69).

La actividad antifúngica de la anfotericina B deriva, en parte, de su estructura anfotérica. Tiende a unirse a esteroides, presentando mayor afinidad por el ergosterol de las membranas fúngicas que por el colesterol de las membranas de las células de los mamíferos. Como consecuencia de esta unión se generan canales en las membranas que permiten la salida al medio extracelular de iones monovalentes intracelulares, particularmente potasio, y de pequeñas moléculas; el cambio en la osmolaridad que se produce en consecuencia es el responsable último de la muerte de la célula (70).

1.8.2.1. Anfotericina B deoxicolato.

Desde su aprobación en 1958 hasta fechas muy recientes ha sido considerada el fármaco de elección en el tratamiento de la aspergilosis invasora debido, esencialmente, a la falta de alternativas terapéuticas. Se ha estado utilizando en la clínica humana durante más de 40 años a pesar de que presenta dos grandes desventajas: que no siempre resulta efectiva y que es altamente tóxica. Aunque no se conoce con exactitud la razón por la que se produzcan fallos terapéuticos con el uso de anfotericina B

deoxicolato se piensa que, al menos en parte, se deben a la falta de biodisponibilidad del principio activo en el foco de infección

La dosis máxima diaria que se puede administrar a los pacientes se encuentra limitada a un máximo de 1-1,5 mg/kg/día debido a la elevada incidencia de efectos tóxicos, tanto directamente relacionados con la infusión (fiebre, escalofríos, cefalea, náuseas y vómitos) como con su toxicidad renal, entre otros. Aunque la nefrotoxicidad que causa habitualmente es reversible, en algunos casos puede provocar una insuficiencia renal permanente (59). El porcentaje medio de respuestas favorables al tratamiento con este fármaco en el caso de la aspergilosis invasora es claramente insatisfactorio. Según reflejan diversos estudios publicados hasta la fecha éste oscila entre el 26 y el 35% (70-74).

Desde el punto de vista farmacocinético la anfotericina B deoxicolato se caracteriza por su elevada unión a proteínas plasmáticas, del 91-95%, y por distribuirse por muchos tejidos de la economía, incluyendo pulmones, bazo, hígado y riñones. Se cree que sigue un modelo de distribución tricompartmental, con un volumen de distribución aparente de 4 L/kg. Tras la infusión de 0.6 mg/kg alcanza un pico sérico máximo de 1-3 µg/mL, aunque estos niveles caen rápidamente para alcanzar una fase valle prolongada en la que se detectan concentraciones de 0,2-0,5 µg/mL (75, 76). En gatos se ha descrito que una dosis de 1 mg/kg de anfotericina B deoxicolato administrada en bolus directamente al ventrículo derecho resulta en concentraciones pulmonares de $4,3 \pm 0,8$ µg/g de pulmón al cabo de 30 minutos, aunque 30 minutos más tarde cae a $1,7 \pm 0,5$ µg/g de pulmón (77). Después de una vida media inicial de 24-48 horas, su vida media terminal de 15 días refleja una liberación lenta desde el compartimento

periférico (75). La anfotericina B no se metaboliza y se puede detectar en bilis y orina más de dos semanas después de haber finalizado el tratamiento (75). En el caso de los pacientes sometidos a hemodiálisis no es preciso realizar un ajuste de dosis, aunque si existe una insuficiencia renal y se produce un deterioro significativo de la función del riñón la dosis debe ser reducida y estrechamente controlada. Su nefrotoxicidad se ve potenciada por el uso concomitante de fármacos como la ciclosporina, los aminoglucósidos o la pentamidina. Otros agentes cuyo uso se debe evitar mientras dure el tratamiento con anfotericina B debido a la posibilidad de interacción medicamentosa son los digitálicos, los bloqueantes neuromusculares y el arabinósido de citosina (78).

Las limitaciones inherentes al uso de este preparado derivadas de su toxicidad, junto a la disponibilidad de otras alternativas terapéuticas aparentemente más eficaces (73) hacen que, en la actualidad, se ponga en tela de juicio la conveniencia de seguir utilizando esta formulación como fármaco de primera línea en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasora (79).

1.8.2.2. Formulaciones lipídicas de anfotericina B. Generalidades.

En la década de los 90 comenzaron a comercializarse las formulaciones lipídicas de anfotericina B. Éstas ofrecen diversas ventajas sobre la formulación convencional, entre ellas la posibilidad de administrar dosis mucho más elevadas, la capacidad para alcanzar altas concentraciones tisulares en los órganos del sistema retículo-endotelial (hígado, bazo, pulmones), la menor tasa de efectos adversos relacionados con la infusión, particularmente con la formulación liposomal, y una notable disminución de la nefrotoxicidad, por lo que su uso está recomendado en aquellos

pacientes en los que, como consecuencia del deterioro de su función renal, sea desaconsejable el empleo de anfotericina B deoxicolato (71).

Las distintas formulaciones lipídicas de anfotericina B difieren entre sí en la relación molar entre su contenido de anfotericina B y de lípidos y en el tipo de lípido utilizado como vehículo, así como en su forma física, su aclaramiento sérico y su tasa de efectos deletéreos (78). Así, las concentraciones séricas y el área bajo la curva de concentración-tiempo (ABC) son mayores para anfotericina B liposomal que para las otras dos formulaciones lipídicas, anfotericina B complejo lipídico y anfotericina B en dispersión coloidal (80). Las formulaciones lipídicas, por otra parte, tienen en común que tienden a concentrarse en el hígado y el bazo. Son recaptadas por los macrófagos retículo-endoteliales desde donde la anfotericina B es liberada lentamente, por lo que estas células pueden ser consideradas reservorios de anfotericina B (81). El grado de recaptación, no obstante, depende del tipo de formulación: es intenso en el caso de la anfotericina B liposomal y la anfotericina B en complejo lipídico y pobre para anfotericina B en dispersión coloidal (81).

A pesar de que se encuentran disponibles para su uso desde hace más de 10 años, aún no se ha demostrado la superioridad, en términos de eficacia clínica, de una formulación lipídica en concreto o de las formulaciones lipídicas frente al preparado clásico mediante estudios que comparen tanto las formulaciones lipídicas entre sí o con anfotericina B deoxicolato, ni se ha establecido la dosis diaria óptima a administrar de las formulaciones lipídicas (82).

1.8.2.3. Anfotericina B liposomal.

Entre los preparados lipídicos de anfotericina B actualmente disponibles se encuentra la anfotericina B liposomal, un compuesto en el que la anfotericina está asociada a liposomas unilamelares de menos de 100 μm de diámetro compuestos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol y diestearoil-fosfatidil-glicerol. Sus propiedades farmacocinéticas difieren sustancialmente de las de anfotericina B deoxicolato, lo que puede ser un importante factor a tener en cuenta en el tratamiento de la aspergilosis invasora. Los estudios preclínicos de farmacocinética de la anfotericina B liposomal mostraron un aclaramiento no lineal desde el plasma, probablemente debido a la saturación del sistema retículo-endotelial, con valores de C_{max} y $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ para la anfotericina administrada en liposomas que aumentan más de lo esperable cuando se incrementa la dosis administrada (83). En estos estudios preclínicos se encontró que la semivida media de eliminación era de 5-24 horas dependiendo de la dosis (rango 1-10 mg/kg) y la especie de animal (ratón, rata, conejo o perro), aunque en todas las especies el volumen de distribución y el aclaramiento total tendió a disminuir a medida que aumentaba la dosis administrada (83).

La integración de la anfotericina B en liposomas induce la circulación prolongada de concentraciones altas del fármaco y el retraso de su aclaramiento hacia los tejidos periféricos (84, 85). Su recaptación por parte del sistema retículo-endotelial es más lenta que la de la formulación de anfotericina B en complejo lipídico y, al igual que ésta última, tiende a concentrarse en hígado y bazo, encontrándose concentraciones más bajas en los tejidos renal, cerebral y cardíaco (86, 87). La concentración pulmonar de

anfotericina B a los 30 y 60 minutos tras la administración intraventricular de 1 mg/kg de esta formulación es $3,4 \pm 1,0$ y $1,1 \pm 0,7$ $\mu\text{g/g}$ de pulmón según un estudio farmacocinético realizado en gatos (77). En un estudio realizado en ratones y recientemente publicado se describe que tras la administración de 4 dosis de 4 mg/kg de anfotericina B liposomal se alcanzan concentraciones pulmonares de anfotericina B de $1,30 \pm 0,51$ $\mu\text{g/g}$ de pulmón y que la concentración pulmonar de anfotericina B aumenta a medida que aumenta la dosis administrada, alcanzando niveles de 3,60 mg/kg de pulmón en los animales que recibieron 4 dosis de 12 mg/kg de anfotericina B liposomal (88). El fallo del hígado, principal componente del sistema retículo-endotelial, puede provocar un aumento de las concentraciones plasmáticas de anfotericina B liposomal en pacientes con insuficiencia hepática y, por tanto, potenciar el depósito de liposomas en los pulmones como órganos responsables del aclaramiento en sustitución del hígado (89).

El estudio de toxicidad *in vivo* de la anfotericina B liposomal más antiguo publicado se practicó en ratones de la cepa C57BL/6, que son muy sensibles a la toxicidad de la anfotericina. En ellos, la dosis intravenosa que provocaba la muerte por toxicidad del 50% de los animales (LD_{50}) fue superior a 175 mg/kg, muy por encima de la LD_{50} de la anfotericina B deoxicolato, que para esta cepa de ratones es de 2-3 mg/kg (90). Desde entonces, se han realizado varios estudios preclínicos destinados a evaluar la toxicidad de la anfotericina B liposomal en ratas, conejos y perros que han confirmado el perfil de seguridad encontrado en ratones (83). En humanos, diversos estudios también han demostrado que puede ser utilizada de forma segura a dosis que superan ampliamente las dosis máximas toleradas de anfotericina B deoxicolato (91, 92).

Actualmente se recomienda el uso de 3-5 mg/kg/día de anfotericina B liposomal para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas como las causadas por *Aspergillus*, *Candida* o *Cryptococcus* (72, 78). A pesar de ser mucho mejor tolerado que la anfotericina B deoxicolato, este preparado no es inócuo y también puede producir, aunque con menos frecuencia, efectos adversos como insuficiencia renal, hepatotoxicidad y escalofríos e hipotensión durante la administración (78).

1.9. NUEVAS ESTRATEGIAS DE ADMINISTRACIÓN DE LA ANFOTERICINA B LIPOSOMAL. FUNDAMENTOS Y PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS.

El principal inconveniente de las pautas actualmente recomendadas para el tratamiento de la aspergilosis invasora es su inaceptablemente elevado índice de fallos terapéuticos. En el caso del tratamiento con anfotericina B, el fracaso terapéutico podría ser en parte debido a que las concentraciones tisulares que se consiguen con las dosis habitualmente administradas sean insuficientes para erradicar el hongo del pulmón, principal órgano diana de la infección por *Aspergillus*. Una posible alternativa terapéutica dirigida a aumentar la eficacia de los tratamientos convencionales pasaría por el diseño de regímenes de administración destinados a conseguir concentraciones pulmonares de anfotericina B más elevadas que las que se alcanzan en la actualidad.

1.9.1. ADMINISTRACIÓN DE DOSIS ALTAS DE ANFOTERICINA B LIPOSOMAL.

La toxicidad sistémica de la anfotericina B liposomal es muy inferior a la de la formulación convencional y se ha demostrado que aquella se puede administrar de forma segura a dosis hasta 10 veces superiores a la dosis máxima tolerada de anfotericina B deoxicolato (93). Por ello, sería posible utilizar dosis altas de anfotericina B liposomal para el tratamiento de la aspergilosis invasora pulmonar.

Dos estudios realizados en ratas demostraron que con la administración crónica de al menos 5 mg/kg/día de anfotericina B liposomal se alcanzan niveles del fármaco muy por encima del valor de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de anfotericina B para *Aspergillus*. En el primero de ellos, Proffitt y colaboradores detectaron concentraciones de anfotericina de $10,35 \pm 1 \mu\text{g/g}$ de tejido pulmonar tras administrar 5 mg/kg/día de anfotericina B liposomal durante 28 días, lo que representa más del doble de la concentración obtenida con 1 mg/kg/día de anfotericina B deoxicolato durante un periodo similar, que fue de $4,56 \pm 0,95 \mu\text{g/g}$ de pulmón (89). El segundo trabajo publicado al respecto, firmado por Bekersky y colaboradores, mostró que tras administrar durante 91 días 12 mg/kg/día de anfotericina B liposomal la concentración pulmonar de anfotericina alcanzaba niveles de 100 $\mu\text{g/g}$ de tejido con una vida media aparente tisular de 1-4 semanas (94). Siguiendo este planteamiento, existen algunos estudios en modelos experimentales que apoyan el aumento de la eficacia de los regímenes basados en la administración de dosis altas de anfotericina B liposomal respecto de la del tratamiento con dosis convencionales de anfotericina B deoxicolato en animales

neutropénicos (95, 96), pero se desconoce si se produce un efecto similar en animales inmunosuprimidos con corticoesteroides.

1.9.2. ADMINISTRACIÓN DE DOSIS DE CARGA DE ANFOTERICINA B LIPOSOMAL.

Como se ha mencionado anteriormente, la incorporación de la anfotericina B a liposomas ha supuesto cambios sustanciales en la farmacocinética de este preparado respecto de la formulación convencional asociada a deoxicolato. Estos cambios pueden ser de gran trascendencia a la hora de plantear otras estrategias de administración de la anfotericina B liposomal.

La particular composición de la anfotericina B liposomal da origen a sus tres principales características farmacocinéticas. Tales son:

- (i) una farmacocinética no lineal, resultado de la saturación del sistema retículo-endotelial y subsiguiente recirculación,
- (ii) concentraciones plasmáticas elevadas de anfotericina B, como se ha demostrado tanto en humanos (93) como en animales (97) y
- (iii) niveles suprainhítorios de anfotericina B tanto en el sistema retículo-endotelial como en otros tejidos animales (98).

Aunque la anfotericina B liposomal, al igual que la convencional, suele administrarse en regímenes diarios, algunos estudios experimentales no clínicos muestran que puede prolongar la supervivencia (99) y reducir significativamente la carga fúngica de localizaciones como el sistema nervioso central (100) cuando se inyecta en días alternos. En un modelo de candidiasis diseminada también se demostró que la administración de dosis de carga

seguidas de dosis más bajas o de dosis altas intermitentes de anfotericina B liposomal era efectiva en términos de prolongación de la supervivencia y de reducción de la carga fúngica renal y que su eficacia se mantenía incluso varias semanas después de finalizar el tratamiento con dosis intermitentes tan elevadas como 20 mg/kg (101). La presencia de concentraciones terapéuticas de anfotericina B liposomal en tejidos infectados durante periodos prolongados de tiempo ha sido descrita en diversos estudios de eficacia de este preparado usado tanto como en regímenes profilácticos (102) como terapéuticos (98, 102, 103) en modelos experimentales de infección tanto fúngica (98, 102) como parasitaria (103). Estos datos apoyarían el planteamiento de un estudio experimental destinado a investigar la eficacia terapéutica de la administración de dosis de carga elevadas discontinuas o seguidas de dosis mucho más bajas en la aspergilosis pulmonar invasora. En la literatura no existe más que una publicación sobre la utilidad de este tipo de esquemas de tratamiento para la aspergilosis experimental en un modelo de ratas neutropénicas (104). En ella, se comparó la eficacia del tratamiento con 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal en monoterapia o con la adición de 1 mg/kg de anfotericina B deoxicolato el primer día de un tratamiento. El uso de una dosis de carga de anfotericina B conseguido mediante el tratamiento combinado resultó en un incremento significativo de la supervivencia y una reducción también significativa de la masa fúngica pulmonar en comparación con la monoterapia (104). A pesar de sus esperanzadores resultados, no se han publicados mas estudios sobre la eficacia del tratamiento con dosis de carga de anfotericina B en la aspergilosis invasora, siendo necesarios nuevos estudios experimentales al respecto para corroborar o rebatir dichos resultados. La ausencia de datos al respecto nos impide actualmente definir la potencial

utilidad de esta estrategia terapéutica en las diferentes situaciones clínicas comprendidas bajo el epígrafe de aspergilosis invasora y que se producen en dos situaciones de riesgo tan claramente diferenciadas desde el punto de vista fisiopatológico como la neutropenia o el tratamiento con corticoesteroides.

1.9.3. ADMINISTRACIÓN NEBULIZADA DE ANFOTERICINA B LIPOSOMAL.

En un intento de minimizar su toxicidad y aumentar al máximo su eficacia terapéutica, se ha propuesto la administración de las diferentes formulaciones de anfotericina B en forma de aerosol. De esta manera se consigue que el fármaco alcance directamente el foco primario de infección a la vez que se evita su toxicidad sistémica, ya que no es absorbido al menos en cantidades significativas. Con respecto a la farmacocinética de la anfotericina B deoxicolato cuando se administra en forma nebulizada, los trabajos de Niki y colaboradores han aportado datos que sugieren que la nebulización favorece que la anfotericina B alcance el tejido pulmonar de forma mucho más eficiente que cuando se administra por vía sistémica, ya que con dos dosis de 1.6 mg/kg de anfotericina B deoxicolato nebulizada se lograron concentraciones pulmonares de 4.34 µg/g, mientras que hicieron falta siete dosis de 4 mg/kg de anfotericina B deoxicolato por vía intravenosa para conseguir concentraciones similares (105). En cuanto a las concentraciones pulmonares conseguidas mediante la administración nebulizada, se ha descrito que los niveles alcanzados con la nebulización de la anfotericina B liposomal son superiores a los conseguidos con anfotericina B deoxicolato. Allen y colaboradores detectaron en ratones inmunosuprimidos con acetato de cortisona concentraciones de $206,67 \pm 17,76$ µg/g de pulmón con la administración de 3 dosis de 6,06 mg/kg/día de

anfotericina B liposomal, 8,6 veces superior a la concentración conseguida con la nebulización de 6,73 mg/kg/día 3 días de anfotericina B deoxicolato, que fue de $24,05 \pm 8,21 \mu\text{g/g}$ (106).

Aunque son numerosos los trabajos experimentales y clínicos relacionados con la eficacia de la anfotericina B nebulizada en la profilaxis de la aspergilosis invasora (106-109) apenas existe información disponible sobre su utilidad como herramienta terapéutica en casos de aspergilosis pulmonar invasora ya establecida (110-112).

1.10. LOS MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN Y SU PAPEL EN LA EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS

Actualmente apenas se concibe el desarrollo de un antimicrobiano sin una cuidadosa evaluación de su toxicidad y eficacia en un modelo animal de infección. Este tipo de estudios *in vivo* está ampliamente reconocido como un puente de unión esencial entre los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* y los estudios clínicos. Desde la década de los 60 se han descrito más de 1000 modelos animales para su aplicación a la quimioterapia experimental. De entre ellos, los conocidos como modelos discriminativos son los que se diseñan para simular una infección humana lo más exactamente posible y distinguir los potenciales efectos terapéuticos de nuevos fármacos, de fármacos ya conocidos o de combinaciones de los mismos y delimitar las indicaciones en las que puedan ser eficaces en humanos (113). En resumen, los modelos animales de infección son el mejor medio de que disponemos para evaluar la eficacia y tolerabilidad de un antimicrobiano antes de que sea administrado a humanos y para encontrar nuevas pautas para el tratamiento de una infección dada. Las ventajas técnicas de los modelos animales, además, no

son menos importantes: facilitan el estudio de grupos homogéneos de sujetos suficientemente grandes como para poder realizar posteriores análisis estadísticos, rinden resultados reproducibles y permiten el estudio independiente de cada efecto a través de la variación de los parámetros investigados (113).

1.11. EL MODELO ANIMAL DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASORA.

1.11.1. IMPORTANCIA DEL MODELO ANIMAL EN EL ESTUDIO DE LA ASPERGILOSIS PULMONAR INVASORA

La importancia de los modelos animales en los estudios de eficacia terapéutica de un antifúngico dado frente a los hongos filamentosos en general y frente a *Aspergillus* en particular deriva de la dificultad de extrapolar los efectos de los antifúngicos *in vitro* a la respuesta *in vivo*. Por un lado, las peculiaridades inherentes al crecimiento de los hongos filamentosos, como la elongación de los micelios o los acúmulos de conidias, hacen que los estudios de sensibilidad basados en el recuento de UFC sean difíciles. Por otro lado, con los estudios de sensibilidad *in vitro* únicamente se puede analizar la actividad del antifúngico sobre el hongo mientras que la respuesta *in vivo* al tratamiento es el resultado de la interacción de tres factores: el microorganismo infectante, el antimicrobiano y el sistema inmune del hospedador. Los modelos animales, además de obviar este inconveniente, permiten comparar un nuevo derivado con la formulación parental o con otro fármaco y evaluar sus posibles ventajas en cuanto a actividad, perfil farmacocinético y formas de administración (114).

La dificultad que entraña la realización de un ensayo clínico de eficacia terapéutica en pacientes con aspergilosis invasora justifica

la falta de estudios en humanos que comparen directamente la actividad de anfotericina B deoxicolato frente a las formas liposomales o la eficacia de nuevos regímenes de tratamiento para esta infección, de ahí que cobren especial importancia los estudios sobre modelos animales de infección a la hora de comparar la actividad de diferentes fármacos antifúngicos o distintas dosis de los mismos.

1.11.2. GENERALIDADES SOBRE LOS MODELOS ANIMALES DE ASPERGILOSIS INVASORA Y SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS.

En los últimos años se han desarrollado diversos modelos animales que pretenden simular la secuencia de la infección invasora por *Aspergillus*. Su diseño ha sido posible gracias a los avances en el conocimiento de la epidemiología y la fisiopatología de la aspergilosis (20).

Se han descrito modelos experimentales de aspergilosis invasora en numerosos animales, incluyendo mamíferos (vacas, monos, roedores), aves (pollos, patos, pavos) e insectos (moscas del vinagre, gusanos de seda) (20, 115-118). La etiopatogenia de la infección, la respuesta inmunológica del hospedador o la utilidad de distintos métodos diagnósticos son diferentes aspectos de la aspergilosis invasora que se han estudiado en estos modelos, aunque su principal campo de aplicación son los estudios de eficacia terapéutica. No hay consenso entre los expertos sobre cuál, de entre la gran variedad de modelos descritos, es el más idóneo para realizar estudios de eficacia de antifúngicos. La revisión de la literatura revela diferencias entre los diferentes grupos de investigación no sólo respecto al tipo de animal empleado (especie, raza y sexo) o el régimen inmunosupresor (dosis, fármaco y pauta

de administración), sino también en cuanto al protocolo de infección (concentración del inóculo y vía de infección) o el momento de inicio y la duración del tratamiento. A pesar de su heterogeneidad, el diseño de los diferentes modelos sigue unas pautas generales comunes:

(i) Para una cepa dada, existe una relación directa entre la dosis de conidias y la mortalidad. Asimismo, es importante tener en cuenta el peso de los animales a la hora de seleccionar la cuantía del inóculo: a medida que aumenta el peso se hace necesario un inóculo mayor para establecer la infección (119, 120).

(ii) Los tratamientos inmunosupresores aumentan considerablemente la sensibilidad de los animales a la infección, observándose notables diferencias entre los patrones de infección e inflamación según el agente inmunosupresor empleado (29). Entre los agentes más utilizados en los modelos murinos se encuentran, por ser de manejo más fácil, los corticoesteroides y la ciclofosfamida. El uso concomitante de dietas bajas en proteínas favorece, en los modelos desarrollados en roedores, la infección experimental por *Aspergillus* (121).

(iii) La infección experimental por vía respiratoria (intranasal o intratraqueal) simula mejor que la vía intravenosa la forma natural de adquisición de la infección. Tras su entrada por vía respiratoria, el hongo invade el tejido pulmonar pudiendo diseminarse, posteriormente, a otros órganos de la economía y, al igual que sucede en humanos, la infección pulmonar sólo se desarrolla cuando el animal está inmunosuprimido. El principal inconveniente de esta ruta de infección es la variabilidad en la respuesta de los animales a la infección para un inóculo

determinado, lo que obliga al uso de un elevado número de animales en cada experimento (20).

(iv) El recuento de unidades formadoras de colonias, pese a ser un método considerado de referencia en las infecciones bacterianas experimentales, es del todo inadecuado en la cuantificación de la carga fúngica presente en los órganos afectados debido al extenso desarrollo del micelio fúngico durante el curso de la infección, a la falta de definición de unidad formadora de colonia en el caso de los hongos filamentosos y a la larga persistencia de conidias viables no germinadas en el tracto respiratorio. La cuantificación de componentes fúngicos que se encuentran en proporción constante durante el crecimiento miceliar, como diversos elementos de forman parte de la pared del hongo, compuestos de almacenamiento, lípidos o enzimas, ha sido considerada una forma más fiable de estimación de la biomasa fúngica presente en un tejido (122).

1.12. MODELO DE ASPERGILOSIS PULMONAR EXPERIMENTAL UTILIZADO EN EL PRESENTE ESTUDIO.

1.12.1. CARACTERÍSTICAS

En los estudios de eficacia de nuevas pautas de administración de anfotericina B se utilizó un modelo animal de infección similar al descrito por Schmitt y colaboradores (111). Algunas de las principales características de este modelo son la utilización de un glucocorticoide, el acetato de cortisona, para producir la inmunosupresión de las ratas, y la obtención de tasas de mortalidad al final del periodo de estudio superiores al 90% en los grupos de animales que no reciben tratamiento antifúngico y de

alrededor del 80% en los animales que reciben tratamiento con anfotericina B deoxicolato.

Los hallazgos histopatológicos típicos de los modelos murinos que utilizan corticoides como inmunosupresores han sido descritos anteriormente por numerosos autores. Entre ellos, Balloy y colaboradores (123) y Duong y colaboradores (124) describen como rasgos más destacados de la inmunosupresión con glucocorticoides el rápido incremento en las primeras 24 horas de leucocitos polimorfonucleares en el lavado broncoalveolar, con recuentos que posteriormente se mantienen constantes, el aumento de células mononucleares al cabo de 72 horas de la infección que alcanza niveles inferiores al observado en ratones inmunocompetentes, la ausencia de α -TNF, el aumento de IL-10 hasta alcanzar un pico de producción a las 72 horas de la infección, la aparición de lesiones alveolocapilares que progresan hasta la muerte de los animales, la presencia de amplios focos neumónicos, bronquiolitis exudativa, destrucción broncoalveolar y necrosis hemorrágica con infiltración por neutrófilos, así como un importante deterioro de la función respiratoria (123, 124). Estas características son claramente diferentes de las que pueden observarse en los animales inmunosuprimidos con agentes quimioterápicos inductores de neutropenia, en los que el lavado broncoalveolar carece por completo de polimorfonucleares, se detectan altos niveles tanto de α -TNF como de IL-10, y se constata un menor daño alveolocapilar, escasas lesiones bronquiolíticas, neumonía difusa con edema y congestión alveolar y ausencia de infiltrado inflamatorio en el tejido pulmonar (123).

1.12.2. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO ACTUAL.

La biodisponibilidad de la anfotericina B tras su administración oral es inferior al 5% (125), de ahí que para el tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras deba ser administrada por vía parenteral. En los modelos animales de infección utilizados en estudios de eficacia terapéutica la administración sistémica de la anfotericina B, sea cual sea el tipo de formulación utilizada, se realiza por inyección intraperitoneal (126) o por vía intravenosa utilizando como accesos la vena lateral de la cola, en el caso de los pequeños roedores (95, 127) o un catéter venoso central, en el caso de animales de mayor envergadura como los conejos (96). El uso de catéteres venosos centrales tiene la ventaja de que permite la infusión lenta, en periodos de 30 minutos, de anfotericina B. En humanos es de sobra conocida la necesidad de administrar la anfotericina B en periodos prolongados de tiempo para evitar reacciones adversas relacionadas con la infusión (128, 129).

Tras su administración parenteral, la anfotericina B puede alcanzar cualquier órgano o tejido de la economía. La exposición sistémica a la anfotericina B, además de aumentar el riesgo de aparición efectos indeseables, ocasiona la dispersión del fármaco, ya que parte de la dosis se acumula en tejidos que no son la diana de la infección de manera que se reduce la biodisponibilidad del antifúngico en el foco de infección. Ésto es de crucial importancia en las fases tempranas de la enfermedad, cuando suele estar aún confinada al pulmón.

La administración de anfotericina B nebulizada consigue elevar las concentraciones pulmonares de anfotericina al máximo minimizando el riesgo de exposición sistémica al antifúngico. En la literatura científica se encuentran descritos dos tipos de dispositivos destinados a la administración de anfotericina B en forma de aerosol a ratas. El aparato más antiguo descrito constaba

de una cámara de nebulización de vidrio dentro de la cual debía permanecer el volumen total de las ratas (111). Este sistema presentaba como principales inconvenientes que la presencia de cuerpos extraños en el interior de la cámara entorpecía el flujo de los aerosoles y que parte de la dosis se perdía ya que, en lugar de ser inhalada, impregnaba la piel y las faneras de los animales o era deglutida. Recientemente se ha descrito una cámara de nebulización en la que sólo el hocico de los animales queda expuesto a los aerosoles, de manera que la mayor parte de la dosis es inhalada y sólo una mínima fracción pasa a otros órganos (130).

1.12.3. VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL MODELO.

En el modelo experimental de infección utilizado en el presente estudio la inmunosupresión, inducida con glucocorticoides, y la inoculación a través del tracto respiratorio propicia que la invasión tisular y el curso de la infección sean similares a los de los enfermos inmunodeprimidos de manera que los parámetros evaluados pueden ser de gran utilidad práctica. Este tipo de modelos de aspergilosis invasora presenta, no obstante, algunas limitaciones de orden técnico como son la necesidad de disponer de personal experimentado y de instalaciones adecuadas para trabajar con animales libres de patógenos sometidos a una intensa inmunosupresión. Otras limitaciones están relacionadas con la cadena de infección de la aspergilosis. Es importante que la cuantía del inóculo sea relativamente moderada y dé lugar a una infección de progreso relativamente lento. La inoculación de una cantidad excesiva de conidias condiciona el desarrollo de una infección respiratoria hiperaguda rápidamente letal, inadecuada para estudios de evaluación de eficacia terapéutica y que difiere de la infección que habitualmente desarrollan los humanos, en los

que se produce la infiltración lenta de los tejidos y su invasión tras la exposición repetida a pequeños inóculos infecciosos (131).

1.13. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA EN LOS MODELOS ANIMALES DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASORA.

1.13.1. GENERALIDADES.

No existe consenso sobre cuales son los indicadores de eficacia terapéutica más adecuados para su estudio en los modelos animales de aspergilosis pulmonar invasora.

La supervivencia (días de supervivencia y porcentaje de animales vivos al final del experimento) es un parámetro universalmente utilizado y aceptado, pero sólo es aplicable a aquellos modelos experimentales caracterizados por una importante mortandad entre los animales que no reciben tratamiento antifúngico (116).

En lo que respecta a los indicadores de carga fúngica tisular o de daño del tejido infectado, aparte de los recuentos de UFC o la cuantificación de componentes de la célula fúngica que se comentan a continuación, se ha utilizado una extraordinaria variedad de parámetros. Algunos de los más utilizados son los estudios histológicos macro y microscópicos, en los que al menos dos observadores independientes asignan de forma subjetiva un valor a la muestra en función del grado de invasión o del daño tisular observado (96, 132), la detección en suero u otros fluidos orgánicos de antígenos fúngicos como el galactomanano (132, 133), de utilidad en modelos de infección que utilizan animales neutropénicos y, ultimamente, la cuantificación por PCR de la carga fúngica en muestras orgánicas para monitorizar la evolución de la infección (134, 135). Otro parámetro utilizado con cierta

frecuencia en modelos animales de aspergilosis pulmonar invasora es el peso del bloque pulmonar, que indica de forma indirecta el grado de daño causado por el hongo en el tejido (96, 132)

1.13.2. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA FÚNGICA EN TEJIDOS ANIMALES:

1.13.2.1. Recuento de unidades formadoras de colonias.

Debido a su naturaleza filamentosa, *A. fumigatus* no presenta una unidad infectiva reproducible ni se puede definir una célula en particular o conjunto de células como unidad formadora de colonias. Tanto las conidias como los pequeños fragmentos de hifas o las masas miceliales más extensas pueden traducirse en colonias aisladas lo que dificulta la interpretación de los recuentos de elementos viables presentes en los homogeneizados de tejidos infectados. No obstante, todos los estudios de eficacia antifúngica publicados hasta la fecha proporcionan datos sobre las diferencias en los recuentos de UFC (116), tal vez por extrapolación al campo de los antifúngicos de la validez de este parámetro en los estudios de eficacia terapéutica de los agentes antibacterianos (136-138).

1.13.2.2. Cuantificación de quitina.

En el caso de los hongos filamentosos los métodos destinados a cuantificar elementos de la estructura fúngica permiten obviar los inconvenientes de los recuentos de unidades formadoras de colonias. Entre estos, se encuentran las técnicas de cuantificación de quitina, compuesto presente en la pared de las células fúngicas de las hifas pero no en las células de los vertebrados y cuya cantidad en la pared de las conidias es inapreciable. Estudios *in vitro* han demostrado que existe una relación lineal entre la cantidad de micelio obtenida por cultivo *in vitro* y su contenido de

quitina (139), por lo que la cuantificación de quitina permite la estimación de la masa fúngica.

La quitina es un polímero constituido por monómeros de N-acetilglucosamina unidos mediante enlaces de tipo $\beta(1-4)$. Las cadenas individuales de quitina se organizan en microfibrillas unidas entre sí de forma antiparalela mediante puentes de hidrógeno y se sitúan en la parte interna de la pared de la célula fúngica formando una estructura rígida que contribuye a darle a ésta su forma (140).

La extracción y cuantificación de quitina en tejidos se realiza mediante técnicas en dos pasos. En el primero, la quitina polimérica es hidrolizada mientras que en el segundo los residuos de azúcar generados se cuantifican colorimétricamente. La hidrólisis de la quitina se consigue mediante técnicas ácidas, alcalinas o enzimáticas. Las técnicas alcalinas tienen como ventajas ser más específicas que las ácidas y más sencillas que las enzimáticas. En el presente estudio se utilizó la técnica de extracción alcalina descrita inicialmente por Ryde y Drysdale (141) y aplicada por Lehmann y White a la cuantificación de la masa fúngica en tejidos animales (139). Con esta técnica, la quitina se desacetila mediante la acción de un álcali, el KOH, y se transforma en quitosano insoluble. Posteriormente el quitosano se despolimeriza y se desamina por la acción del HNO_2 convirtiéndose en un aldehído soluble que puede ser cuantificado por colorimetría.

En los presentes estudios de eficacia terapéutica sólo se evaluaron las diferencias en el contenido pulmonar de quitina de los animales tratados con anfotericina B 5 días o más porque estudios preliminares demostraron que a partir del 5º día de la infección la cantidad de quitina en los pulmones de las ratas se estabiliza de

manera que las diferencias en la biomasa fúngica que haya podido desarrollarse en el tejido durante los primeros días de tratamiento se hacen evidentes a partir de este momento (142).

La validez de este parámetro en estudios de eficacia terapéutica de antifúngicos frente a infecciones por *Aspergillus* está corroborada por los trabajos de otros autores que confirman su utilidad frente a la de los recuentos de UFC (143).

2. PUBLICACIONES

La presente memoria de investigación compila tres trabajos experimentales. Los objetivos generales del conjunto, así como los objetivos particulares de cada uno de los estudios que la componen se detallan a continuación.

2.1. OBJETIVOS GENERALES.

- 1°. Adaptar y validar un modelo animal de aspergilosis pulmonar invasora en ratas inmunosuprimidas con glucocorticoides que simula la infección en humanos.
- 2°. Evaluar la utilidad del modelo animal de aspergilosis pulmonar invasora en estudios de eficacia terapéutica con antifúngicos.
- 3°. Evaluar la eficacia terapéutica de nuevas estrategias de administración de la anfotericina B liposomal..

2.2. OBJETIVOS CONCRETOS.

2.2.1. OBJETIVOS CONCRETOS DEL ESTUDIO 1.

- 1°. Evaluar la eficacia de anfotericina B deoxicolato a dosis convencionales de 1 mg/kg/día.
- 2°. Establecer una relación entre la administración de dosis crecientes de anfotericina B liposomal y la eficacia terapéutica de las mismas.

2.2.2. OBJETIVOS CONCRETOS DEL ESTUDIO 2.

- 1°. Evaluar la eficacia del tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasora experimental con dosis de carga iniciales elevadas de anfotericina B liposomal por vía intravenosa.

- 2°. Evaluar la eficacia del tratamiento intravenoso de la aspergilosis pulmonar invasora experimental con dosis de carga iniciales elevadas de anfotericina B liposomal seguidas de la administración de dosis bajas.

2.2.3. OBJETIVOS CONCRETOS DEL ESTUDIO 3.

- 1°. Evaluar la eficacia terapéutica de la anfotericina B deoxicolato administrada por vía inhalatoria.
- 2°. Evaluar la eficacia terapéutica de la anfotericina B liposomal administrada por vía inhalatoria.
- 3°. Evaluar la eficacia terapéutica de la administración combinada de anfotericina B liposomal por vía inhalatoria e intravenosa.

2.3. ESTUDIO 1.

“Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the
treatment of experimental aspergillosis”

María Teresa Martín, Joan Gavaldà, Pedro López, Xavier Gomis,
José Luís Ramírez, Dolors Rodríguez, Óscar Len, Queralt Jordano,
Isabel Ruiz, Marta Rosal, Benito Almirante y Albert Pahissa.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2003) 52: 1032-1034

2.3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO DEL ESTUDIO 1.

La respuesta al tratamiento con anfotericina B liposomal de la aspergilosis pulmonar invasora experimental es tanto más favorable, en términos de aumento de supervivencia y reducción del daño pulmonar y la masa fúngica, cuanto mayores son las dosis administradas de este preparado.

2.3.2. OBJETIVOS CONCRETOS DEL ESTUDIO 1.

- 1°. Evaluar la eficacia de anfotericina B deoxicolato a dosis convencionales de 1 mg/kg/día
- 2°. Establecer una relación entre la administración de dosis crecientes de anfotericina B liposomal y la eficacia terapéutica de las mismas.

Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis

María Teresa Martín, Joan Gavalda*, Pedro López, Xavier Gomis, José Luís Ramírez, Dolores Rodríguez, Oscar Len, Queralt Jordano, Isabel Ruiz, Marta Rosal, Benito Almirante and Albert Pahissa

Infectious Diseases Research Laboratory, Infectious Diseases Division, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

17 March 2003; returned 25 May 2003; revised 26 September 2003; accepted 3 October 2003

Objective: Differences in efficacy between deoxycholate amphotericin B (d-AmB) and escalating doses of liposomal amphotericin B (L-AmB) were evaluated in a model of invasive pulmonary aspergillosis in persistently steroid-immunosuppressed rats.

Methods: Animals were infected intratracheally with a conidial suspension of a clinical isolate of *Aspergillus fumigatus* and randomized to receive intravenously 5% dextrose, 1 mg/kg/day of d-AmB or 3, 5 or 10 mg/kg/day of L-AmB.

Results: All the antifungal treatments improved survival, although no differences were found among the groups, perhaps because of treatment-related toxicity. In animals surviving long enough to receive at least five doses of antifungal treatment, there were significant reductions in paired lung weight in the 5 and 10 mg/kg/day L-AmB groups as compared with the controls ($P = 0.004$ and 0.001 , respectively) and with the 3 mg/kg/day L-AmB group ($P = 0.007$ and 0.002 , respectively). Significant decreases in fungal biomass, measured indirectly by chitin quantification, were found only in the 10 mg/kg/day L-AmB group as compared with controls ($P = 0.003$), d-AmB ($P = 0.007$) and 3 mg/kg/day L-AmB ($P = 0.001$).

Conclusion: Infusion of L-AmB doses as high as 10 mg/kg/day may be a good therapeutic option for the management of invasive pulmonary aspergillosis developing in the context of steroid immunosuppression, although further studies are needed to assess this approach.

Keywords: antifungal treatment, efficacy, invasive pulmonary aspergillosis

Introduction

Current strategies for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) yield suboptimal overall response rates of around 35%–50%, underlining an urgent need for new therapeutic approaches to this infection. In recent years, lipid formulations of amphotericin B, such as liposomal amphotericin B (L-AmB) have become available, with rates of adverse effects lower than the conventional formulation, thus allowing the use of large doses.¹

Animal pharmacokinetic models have shown that the larger the dose of L-AmB, the higher the tissue concentration achieved, even in the lungs,² where aspergillus infection used primarily to be located.

Infusion of large L-AmB doses, which have been proven safe for humans,¹ could therefore provide drug concentrations of sufficient strength to be fungicidal in the lungs; this is considered a promising strategy for the treatment of IPA.

A dose-escalating study was carried out, in an experimental model of IPA induced in persistently steroid-immunosuppressed rats, comparing the efficacy of 3, 5 and 10 mg/kg/day L-AmB with that of 1 mg/kg/day deoxycholate amphotericin B (d-AmB). Among other parameters, the chitin content of the lungs was used to assess the therapeutic response, since it permits quantitative estimation of the fungal load in tissues of infected animals.³

*Correspondence address. Servei de Malalties Infeccioses, Hospital General Vall d'Hebron. Passeig Vall d'Hebron, 119–129, 08035 Barcelona, Spain. Tel: +34-93-4894033; Fax: +34-93-2746057; E-mail: jgavalda@vhebron.net

Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis

Table 1. Results of the therapeutic efficacy in the treatment groups

	Total no. of rats	Days of survival ^a	Rats surviving ≥ 5 days of treatment			
			no. of animals (% of total)	mean log ₁₀ of cfu/g of lung ^b	weight of paired lungs in g ^b	log ₁₀ μ g of glucosamine/ paired lungs ^b
Control	34	4.44 \pm 2.79	11 (32.4)	2.85 (1.08–4.61)	2.59 (2.22–2.96)	2.18 (1.95–2.42)
d-AmB 1 mg/kg/day	26	7.35 \pm 2.51*	20 (76.9)	2.75 (2.37–3.14)	2.04 (1.67–2.41)	2.06 (1.85–2.26)
L-AmB 3 mg/kg/day	26	7.69 \pm 2.80*	19 (73.1)	3.82 (3.33–4.31)	2.40 (1.95–2.86)	2.14 (1.92–2.36)
L-AmB 5 mg/kg/day	24	8.33 \pm 2.55*	20 (83.3)	3.07 (2.38–3.75)	1.64 (1.38–1.90)*,‡	1.88 (1.74–2.01)
L-AmB 10 mg/kg/day	27	7.33 \pm 2.69*	19 (70.4)	2.51 (2.05–2.97)‡	1.52 (1.28–1.77)*,‡	1.59 (1.35–1.83)*,‡,§

^aData are shown as mean \pm S.D.

^bData expressed as mean (95% confidence interval).

* $P < 0.015$ compared with control, † $P < 0.015$ compared with d-AmB 1 mg/kg/day, ‡ $P < 0.015$ compared with 3 mg/kg/day of L-AmB.

Methods

A previously described animal model of IPA was used.⁴ SPF female Wistar rats weighing 180–200 g were obtained from Harland Iberica (Barcelona, Spain). Rats were fed an 8% protein diet and sterile water *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron Hospitals and the Generalitat de Catalunya.

Animals were immunosuppressed with 125 mg/kg of subcutaneous cortisone acetate (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) three times per week—starting 14 days before the fungal challenge—until the end of the experiment. Four days before the infection, a sterile silastic catheter was inserted surgically through the right jugular vein into the inferior vena cava to administer antifungal treatment. The line was tunnelled subcutaneously, brought to the interscapular region and connected to a subcutaneous port. On day 14, rats were infected intratracheally with 0.3 mL of a conidial suspension, adjusted in sterile saline to 8×10^6 cells/mL. A clinical isolate of *Aspergillus fumigatus* (MIC of amphotericin B = 1 mg/L, in accordance with NCCLS procedures⁵) was used.

Antifungal therapy was administered intravenously starting 24 h after infection and lasted 10 days. Animals were assigned randomly to receive 5% dextrose (control, $n = 34$), 1 mg/kg/day of d-AmB (Fungizone, Bristol-Myers Squibb Group, Spain) ($n = 26$), or 3 ($n = 26$), 5 ($n = 24$) or 10 ($n = 27$) mg/kg/day of L-AmB (AmBisome, Gilead Sciences, Spain). They were checked periodically every day until day 12 after fungal infection. Mortality was recorded throughout this period. Surviving rats were sacrificed 24 h after the last dose of antifungal treatment. Dead and euthanized animals were dissected. Lungs were removed aseptically, weighed and homogenized in 10 mL of sterile distilled water for chitin assay, which was used to quantify the fungal burden in the lungs, as described elsewhere.³ A small aliquot of lung homogenates was plated onto Sabouraud dextrose agar and trypticase soy blood agar plates to assess fungal growth qualitatively and to rule out bacterial superinfection.

For toxicity studies, groups of steroid- and non-steroid-treated uninfected rats were given a 10 day course of antifungal treatment, using a scheme similar to that of the therapeutic efficacy study; mortality and biochemical parameters (liver and kidney function) were determined. Survival was analysed using Kaplan–Meier plots. Lung weight (in grams) and pulmonary chitin content (in log₁₀ micrograms of glucosamine per paired lungs) were expressed as the mean and 95% confidence interval of the mean, and were compared using one-way ANOVA analysis and the Tukey's pairwise test as statistics, at an overall error rate of 5%. P values less than or equal to 0.015 were considered significant.

Results

The results of the therapeutic efficacy for the different regimens are summarized in Table 1.

As shown in Figure 1, mean survival time was increased significantly with all amphotericin B treatments with respect to the control group ($P \leq 0.0015$). No significant differences in survival were found among the four treatment regimens studied; however, survival data were not analysed further since treatment-related mortality was found in uninfected immunosuppressed rats, as explained later.

Inter-group differences in lung weight and chitin content were found in animals that survived long enough to receive at least five doses of treatment. Paired lung weight, indicative of organism-mediated pulmonary injury, was significantly lower in animals given 5 or 10 mg/kg/day of L-AmB as compared with the control ($P = 0.004$ and 0.001, respectively) or 3 mg/kg/day L-AmB groups ($P = 0.007$ and 0.002, respectively). A dose-dependent effect was also found for the chitin content of lungs, which was significantly lower in rats receiving 10 mg/kg/day of L-AmB than in controls ($P = 0.003$), and the d-AmB ($P = 0.007$) and 3 mg/kg/day L-AmB ($P = 0.001$) groups.

No signs of toxicity were observed in uninfected non-immunosuppressed animals, whereas deaths were recorded in non-infected steroid-treated rats given d-AmB (three out of eight), 5 mg/kg/day of L-AmB (two out of seven) or 10 mg/kg/day of L-AmB (four out of eight) for 4 days or more. Analytical parameters determined in blood samples at the end of the experiment were insufficiently definitive to establish the origin of the drug-related toxicity (data not shown).

Discussion

In this study, the efficacy of d-AmB and escalating doses of L-AmB were compared using an experimental model of pulmonary aspergillosis. The aim was to determine whether increases in L-AmB dosage up to 10 mg/kg/day could lead to an improvement in antifungal efficacy.

There were no differences in survival among the groups receiving antifungal treatment. However, this was probably related to the fact that chronic administration of steroids and amphotericin B (particularly at high doses) in uninfected rats caused the death of animals. The

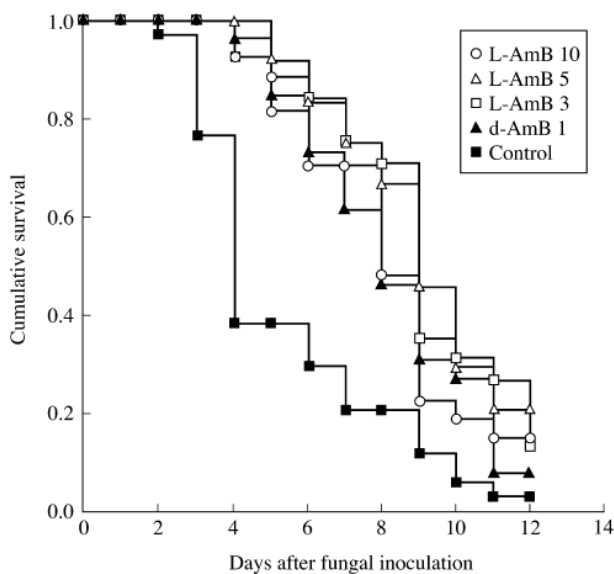
M. T. Martín *et al.*

Figure 1. Effect of d-AmB versus different doses of L-AmB or no treatment on the cumulative survival of rats with IPA. Solid square, control group; solid triangle, 1 mg/kg/day of d-AmB; open square, 3 mg/kg/day of L-AmB; open triangle, 5 mg/kg/day of L-AmB; open circle, 10 mg/kg/day of L-AmB.

nature of this possible cumulative cross-toxicity could not be determined, although it has been shown that the combination of d-AmB and steroids has deleterious effects in mice.⁶ To our knowledge, no interaction between steroids and L-AmB has been described in humans.

Since survival rates could not be used as a reliable parameter, other therapeutic endpoints were investigated. When mean \log_{10} cfu was compared, a significant difference was found only between the 3 and 10 mg/kg/day L-AmB groups ($P = 0.012$). This absence of differences may be related to the fact that single conidia, clusters of spores, or hyphal fragments—having a great variety of lengths—can all be quantified as unique colonies in culture plates. Since a cfu has not yet been defined for filamentous moulds, the number of cfu probably does not accurately reflect the viable fungal biomass. Therefore, quantitative or semi-quantitative cultures would not be a reliable index to estimate reductions in tissue fungal loads, as previously indicated by other authors.⁷ To avoid this problem, it has been suggested that a more reliable method of measuring fungal burden in tissues would be by quantification of fungal cell elements.⁸ Thus, quantification of chitin, a β -1,4 glycan found in the fungal cell wall that increases with hyphal growth,³ was used to compare the decrease in the aspergillar load in the lungs of the animals of the different treatment groups. By means of chitin quantification, significant differences in efficacy were found between the largest dose of L-AmB and the controls, d-AmB and 3 mg/kg/day of L-AmB. Additionally, a non-significant trend towards a reduced pulmonary fungal load was found with 5 mg/kg/day of L-AmB. Similar results were found using the lung weight as an endpoint for therapeutic efficacy. Our results are in the line with those reported by other groups in neutropenic animals, although it is difficult to establish comparisons between different experimental models and endpoints. Leenders *et al.*⁹ found that both d-AmB and 10 mg/kg of L-AmB delayed mortality and

significantly increased survival when compared with a control group. Nevertheless, only 10 mg/kg of L-AmB reduced dissemination to the right lung and completely prevented dissemination to extrapulmonary organs in neutropenic rats. Dosages equal to or larger than 5 mg/kg/day have also resulted in both prolonged survival and decreased pulmonary injury in neutropenic rabbits.¹⁰

The dose-dependent efficacy of L-AmB may be of major importance in the management of pulmonary aspergillosis in immunosuppressed individuals. In our experimental model of IPA, the chronic infusion of L-AmB at doses as high as 10 mg/kg/day was more effective than lower doses of L-AmB or 1 mg/kg/day of d-AmB in reducing pulmonary chitin content as a measure of fungal burden. Increases in L-AmB doses up to 10 mg/kg/day could be useful for the treatment of pulmonary aspergillosis. Further clinical studies are needed to assess this approach.

Acknowledgements

We thank Celine Cavallo for assistance with the English.

This work has been supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS exp no. 99/0894)

References

- Walsh, T. J., Goodman, J. L., Pappas, P. *et al.* (2001). Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 3487–96.
- Proffitt, R. T., Satorius, A., Chiang, S. *et al.* (1991). Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **28**, Suppl. B, 49–61.
- Lehmann, P. F. & White, L. O. (1975). Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infection and Immunity* **12**, 987–92.
- Niki, Y., Bernard, E. M., Edwards, F. F. *et al.* (1991). Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 1317–22.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1998). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi: Proposed Standard M-38P*. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Kisch, A. L., Maydew, R. P. & Evan, A. P. (1978). Synergistic nephrotoxicity of amphotericin B and cortisone acetate in mice. *Journal of Infectious Diseases* **137**, 789–94.
- Becker, M. J., de Marie, S., Fens, M. H. A. M. *et al.* (2002). Enhanced antifungal efficacy in experimental invasive pulmonary aspergillosis by combination of AmBisome with Fungizone as assessed by several parameters of antifungal response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 813–20.
- Prosser, J. I. (1994). Kinetics of filamentous growth and branching. In *The Growing Fungus*, 1st edn (Gow, N. A. R. & Gadd, G. M., Eds), pp. 301–18. Chapman & Hall, London, UK.
- Leenders, A. C. A. P., de Marie S., ten Kate, M. T. *et al.* (1996). Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **38**, 215–25.
- Francis, P., Lee, J. W., Hoffman, A. *et al.* (1994). Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalveolar D-mannitol and serum galactomannan as markers of infection. *Journal of Infectious Diseases* **169**, 356–68.

2.4. ESTUDIO 2.

“Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis”.

J. Gavaldà, T. Martín, P. López, X. Gomis, J. L. Ramírez, D.

Rodríguez, Ó. Len, Y. Puigfel, I. Ruiz y A. Pahissa.

Clinical Microbiology and Infection (2005) **11**: 999-1004.

2.4.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO DEL ESTUDIO 2.

La administración de anfotericina B incorporada en liposomas resulta en un perfil farmacocinético significativamente diferente del observado con la anfotericina B deoxicolato. Estas diferencias se traducen en una concentración plasmática máxima (C_{max}) y un tiempo de exposición (ABC_{0-24}) mayores que las observadas con anfotericina B deoxicolato; además, la farmacocinética de la formulación liposomal no es lineal sino que tras la primera dosis las concentraciones plasmáticas aumentan más de lo que correspondería al aumento de la dosis, lo que se atribuye a la saturación del sistema retículo endotelial. Estos cambios en el comportamiento farmacocinético de la anfotericina B liposomal se pueden aprovechar para conseguir un aumento de concentración de anfotericina B en el pulmón.

Ya que la eficacia terapéutica de la anfotericina B liposomal en la aspergilosis pulmonar experimental aumenta cuando se incrementa la cantidad de anfotericina B disponible en el foco de infección se puede lograr un aumento de la biodisponibilidad de este fármaco en el pulmón administrando por vía sistémica dosis elevadas de anfotericina B liposomal al inicio del tratamiento. Esto lleva a la saturación precoz de las células del sistema retículo-endotelial del hígado y el bazo, que son las que principalmente recaptan este preparado desde la sangre y lo almacenan para posteriormente volver a liberarlo lentamente a la circulación sistémica. Así, tras el tratamiento inicial con dosis elevadas se puede continuar el tratamiento con dosis menores de anfotericina B liposomal.

2.4.2. OBJETIVOS CONCRETOS DEL ESTUDIO 2.

- 1°. Evaluar la eficacia del tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasora experimental con dosis de carga iniciales elevadas de anfotericina B liposomal por vía intravenosa.
- 2°. Evaluar la eficacia del tratamiento intravenoso de la aspergilosis pulmonar invasora experimental con dosis de carga iniciales elevadas de anfotericina B liposomal seguidas de la administración de dosis bajas.

Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis

J. Gavalda, T. Martín, P. López, X. Gomis, J. L. Ramírez, D. Rodríguez, Ó. Len, Y. Puigfel, I. Ruiz and A. Pahissa

Servei de Malalties Infeccioses, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

This study aimed to investigate whether initial treatment of experimental pulmonary aspergillosis with high loading doses can be used as an alternative to standard therapeutic regimens. Steroid-immunosuppressed rats, infected intratracheally with *Aspergillus fumigatus*, received either amphotericin B deoxycholate (d-AmB) 1 mg/kg/day, liposomal amphotericin B (L-AmB) 5 mg/kg/day, or underwent a 3-day course of L-AmB 10 mg/kg, or 10 mg/kg for the first 3 or 4 days of treatment, followed by 3 mg/kg until the end of treatment. Therapy started 24 h after fungal challenge and lasted for 7 days. Compared to controls, survival was improved significantly in animals receiving any L-AmB regimen ($p \leq 0.003$), but not d-AmB. Compared with d-AmB, L-AmB at initial doses of 10 mg/kg followed by 3 mg/kg/day was consistently more effective, but only when measured in terms of survival, lung weight and glucosamine levels, and not log CFU. Despite the absence of significant differences between any of the L-AmB regimens, a trend towards better response rates with the higher loading dose was observed.

Keywords Amphotericin B, animal model, aspergillosis, invasive disease, loading doses, therapy

Original Submission: 19 November 2004; **Revised Submission:** 22 April 2005; **Accepted:** 31 May 2005

Clin Microbiol Infect 2005; 11: 999–1004

INTRODUCTION

Liposomal amphotericin B (L-AmB) has become a therapeutic alternative to amphotericin B deoxycholate (d-AmB) for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis (IPA), which is an infection that is generally lethal when left untreated [1]. Current recommendations for the treatment of systemic aspergillosis include the use of d-AmB 1–1.5 mg/kg/day, L-AmB 5 mg/kg/day, or voriconazole, as first-line therapy, with caspofungin as an alternative [2–4]. However, there is still a need for new strategies in the treatment of invasive aspergillosis in order to diminish the current high rates of therapeutic failure. The maximum dose of d-AmB recommended for administration to humans is 1.5 mg/kg/day because of intolerance

and other adverse effects [5]; however, L-AmB has lower toxicity than d-AmB, thus allowing the infusion of significantly higher doses. Animal models of invasive aspergillosis have shown outcome benefits (i.e., increased survival, reduction of fungal load) with the use of L-AmB 10 mg/kg/day [6–8]. A recent study conducted in humans found that doses up to 15 mg/kg were safe and well-tolerated [9], and preliminary results from a pilot prospective open-label study have shown that L-AmB 10 mg/kg/day may be a safe and effective alternative for the management of invasive aspergillosis in immunocompromised patients (43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2003, abstract M-966).

In addition to reduced toxicity, the incorporation of amphotericin B into lipid vesicles [10] has modified the pharmacokinetics of the drug with respect to the conventional deoxycholate-associated formulation of amphotericin B [11], although the impact of these changes on the treatment of lung infection by *Aspergillus fumigatus* is still

Corresponding author and reprint requests: J. Gavalda Santapau, Servei de Malalties Infeccioses, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg. Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain
E-mail: address: jogavalda@vhebron.net

unknown. Moreover, it has been suggested that the pharmacokinetic profile means that an improved treatment outcome might be achieved with administration of high loading doses [12]. The present experimental study investigated whether initiating treatment for IPA with L-AmB 10 mg/kg, a level associated with maximum plasma concentrations in humans [9], and then continuing with lower doses, may represent an alternative to the classical treatment with d-AmB 1 mg/kg/day. In addition, the efficacy of initial high doses followed by low doses was compared with that of L-AmB 5 mg/kg/day in a steroid-immunosuppressed rat model of infection.

MATERIALS AND METHODS

Strain

A clinical isolate of *A. fumigatus*, strain AFJJ (deposited at the National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) was used throughout the study. The strain was maintained on Sabouraud dextrose agar (SDA) slants at -80°C . The susceptibility of this strain to amphotericin B was 1 mg/L when determined according to NCCLS guidelines [13].

Animals

Female SPF Wistar rats weighing 180–200 g (Harland Iberica, Barcelona, Spain) were housed in cages with HEPA filters and fed with a protein 8% w/w diet and sterile water *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron Hospitals and the Autonomous Government of Catalonia.

Animal model

The study was carried out in an animal model of IPA, described previously [14]. Briefly, animals were immunosuppressed with subcutaneous cortisone acetate 125 mg/kg (Sigma, St Louis, MO, USA) three times/week, starting 14 days before the fungal challenge and continuing to the end of the experiment. To avoid bacterial superinfection during immunosuppression, rats were given colistin 2500 IU/mL in drinking water, and cefepime 150 mg/kg twice-daily subcutaneously. Four days before the infection, a sterile silastic catheter connected to a subcutaneous port was inserted surgically through the right jugular vein into the inferior cava vein for the administration of antifungal treatment [15]. All surgical procedures were performed under general anaesthesia (ketamine 100 mg/kg plus xylazine 10 mg/kg, intramuscularly).

After six doses of steroids (day 0), rats were infected via a tracheotomy with 0.3 mL of a freshly prepared conidial suspension harvested from a subculture of the *A. fumigatus* strain grown on SDA plates. Conidia were harvested with a sterile pipette by flooding the plates with sterile saline containing Tween-20 0.025% v/v. The resulting suspension was washed in sterile phosphate-buffered saline, counted in a haemocytometer, and adjusted in sterile saline to a final concentration of 8×10^6 conidia/mL. Serial ten-fold dilutions

were plated on to SDA plates for assessment of purity, size and viability of the inoculum. At least 95% of conidia in the inoculum were viable as assessed by colony counts.

Antifungal therapy

Eight doses of antifungal treatment were administered intravenously, starting 24 h after infection. Animals were assigned randomly to receive either dextrose 5% w/v (control, $n = 52$), d-AmB (Fungizone; Bristol-Myers Squibb Group, Barcelona, Spain) 1 mg/kg/day ($n = 28$), L-AmB (AmBisome, Gilead Sciences, Madrid, Spain) 5 mg/kg/day ($n = 33$), L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days ($n = 34$), or L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days ($n = 34$) or 4 days ($n = 21$), followed by L-AmB 3 mg/kg/day until the end of treatment. Antifungal drugs were prepared immediately before use, according to the manufacturers' instructions.

Assessment of antifungal efficacy

Animals were inspected every 4 h from 08.00 h to 00.00 h, and mortality was recorded throughout the experiment. Surviving rats were killed humanely 24 h after the last dose of antifungal treatment. Animals were dissected immediately after death. Lungs were removed aseptically, weighed and homogenised in 10 mL of sterile distilled water for 15 s with a tissue homogeniser (Ultraturrax T25 basic; IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Aliquots (500 μL) of homogenates were diluted serially and plated on to SDA and trypticase soy blood agar plates to assess fungal growth quantitatively and to rule out bacterial superinfection. Data from animals dying during the night could introduce a confounding factor in post-mortem multiplication, although this factor was equal in all groups.

Lung homogenates were processed for chitin assays to quantify the fungal burden in lungs [16]. With this technique, chitin is depolymerised, deaminated and deacetylated to glucosamine monomers [17]. In brief, homogenates were centrifuged, resuspended in 4 mL of 0.1 M sodium lauryl sulphate (Sigma), heated at 100°C for 15 min and left to cool. Pellets were washed in distilled water, resuspended in 3 mL of 21.39 M KOH (Sigma) and heated at 130°C for 1 h. After addition of 8 mL of ice-cold ethanol 75% v/v, tubes were kept in ice-cold water for 15 min, and then 0.3 mL of a suspension of diatomaceous earth (Celite 545, Sigma) in ethanol 75% v/v was added. Pellets were washed once with ice-cold ethanol 40% v/v, and twice with distilled water. The supernatants were discarded, the resultant pellets were resuspended in distilled water to a volume of 0.5 mL, and 0.5 mL of 0.72 M NaNO_2 and 0.5 mL of 0.37 M KHSO_4 were then added. The tubes were centrifuged and volumes of the supernatants were mixed with 0.2 mL of 1.1 M ammonium sulphamate, followed by 0.2 mL of 3-methylbenzothiazolone hydrazone hydrochloride monohydrate (Sigma), and heated for 3 min. The supernatants were left to cool, 0.2 mL of 0.03 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was added, and the optical density was read in a spectrophotometer (UV-160A; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) at 650 nm after 25 min.

Statistical analysis

Survival was analysed with Kaplan–Meier plots and the log-rank test. Lung weight (g), pulmonary chitin content (\log_{10} μg glucosamine/paired lungs) and \log_{10} CFU were compared

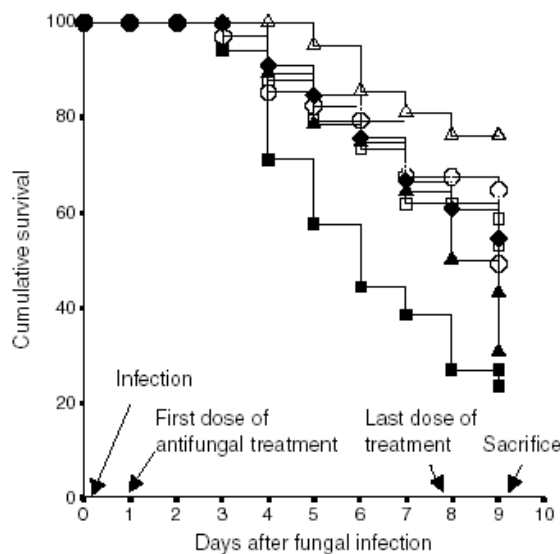


Fig. 1. Effect of amphotericin B deoxycholate (d-AmB) vs. different regimens of liposomal amphotericin B (L-AmB) or control on the cumulative survival of steroid-immunosuppressed rats with invasive pulmonary aspergillosis. Filled squares, control; filled triangles, d-AmB 1 mg/kg/day; filled diamonds, L-AmB 5 mg/kg/day; open squares, L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days; open circles, L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days, followed by L-AmB 3 mg/kg/day; open triangles, L-AmB 10 mg/kg/day for 4 days, followed by L-AmB 3 mg/kg/day.

using the Mann-Whitney *U*-test. Unless indicated otherwise, results were expressed as the mean and 95% CI of the mean, with $p \leq 0.05$ considered significant.

No correction for multiple comparisons was used.

RESULTS

Data from the four experiments performed were pooled, as no statistically significant differ-

ences were found between the controls of each experiment.

Survival of animals receiving antifungal treatment was improved compared with the control group, with significant differences for groups receiving L-AmB treatment: $p < 0.003$ for L-AmB 5 mg/kg/day and L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days (Fig. 1); $p < 0.002$ and $p < 0.001$, respectively, for L-AmB 10 mg/kg/day for 3 or 4 days, followed by 3 mg/kg/day until the end of treatment. No differences were found between the L-AmB-based regimens; however, L-AmB 10 mg/kg/day for 4 days followed by 3 mg/kg/day was the only regimen that resulted in significantly increased survival with respect to the d-AmB regimen ($p < 0.009$).

Results observed in animals that survived ≥ 5 days of antifungal treatment are summarised in Table 1. There was a significant reduction in lung weight, which is a marker of fungus-related tissue injury, in all the groups receiving L-AmB when compared with the controls ($p < 0.001$ for L-AmB 5 mg/kg/day; $p < 0.001$ for L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days, and for L-AmB 10 mg/kg/day for 3 or 4 days, followed by 3 mg/kg/day). Again, although there were no differences between the groups receiving L-AmB 5 mg/kg/day throughout and those receiving high loading doses, the lung weights of the animals in the groups given L-AmB 10 mg/kg/day for 3 or 4 days, followed by 3 mg/kg until the end of the experiment, were significantly lower than those of animals receiving d-AmB ($p < 0.016$ and $p < 0.009$, respectively). With respect to fungal load, the chitin content in the lungs was found to be lower in rats receiving antifungal treatment than in controls. Statistically

Table 1. Results obtained with the different treatment groups

Group	Animals surviving treatment for ≥ 5 days						
	Total	Survival: mean (95% CI)	<i>n</i> (%)	Weight of paired lungs (g): mean (95% CI)	Log ₁₀ µg glucosamine/ paired lungs: mean (95% CI)	Log ₁₀ CFU/g of lungs: mean (95% CI)	
Control	52	5.60 (4.90-6.29)	23 (44.23)	2.87 (2.42-3.31)	2.11 (1.87-2.35)	5.40 (5.17-5.62)	
d-AmB 1 mg/kg/day	28	7.00 (6.14-7.86)	21 (75)	2.30 (1.91-2.69)	2.06 (1.82-2.30)	5.19 (4.93-5.44)	
L-AmB 5 mg/kg/day	33	7.33 (6.56-8.10) ^a	25 (75.76)	1.87 (1.56-2.19) ^a	1.88 (1.61-2.15)	5.22 (5.01-5.44)	
L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days	34	7.24 (6.42-8.05) ^a	25 (73.53)	1.84 (1.57-2.10) ^a	1.97 (1.69-2.24)	5.22 (4.94-5.51)	
L-AmB 10 mg/kg/day for 3 days + 3 mg/kg/day ^b	34	7.44 (6.61-8.27) ^a	27 (79.41)	1.76 (1.43-2.10) ^{a,c}	1.74 (1.49-1.99) ^a	5.18 (4.99-5.37)	
L-AmB 10 mg/kg/day for 4 days + 3 mg/kg/day ^d	21	8.14 (7.39-8.89) ^{a,c}	18 (85.71)	1.61 (1.31-1.91) ^{a,c}	1.59 (1.29-1.90) ^{a,c}	5.02 (4.74-5.31) ^a	

L-AmB, liposomal amphotericin B; d-AmB, amphotericin B deoxycholate.

^a $p \leq 0.05$ with respect to controls.

^bL-AmB 10 mg/kg/day for 3 days, followed by 3 mg/kg/day until the end of therapy.

^c $p \leq 0.05$ with respect to d-AmB 1 mg/kg/day.

^dL-AmB 10 mg/kg/day for 4 days, followed by 3 mg/kg/day until the end of therapy.

significant differences with respect to the controls were evident only in groups that received doses of L-AmB 10 mg/kg/day for the first 3 (p 0.020) or 4 (p 0.009) days, followed by 3 mg/kg/day, but only the latter was significantly different from the d-AmB group (p 0.028). Outcome in the group in which L-AmB was suspended after 3 days tended to be poorer than in the animals that continued to receive low doses of L-AmB to the end of treatment, but no significant differences were found among these groups. As summarised in Table 1, the CFU/g of lung count was similar in nearly all the groups. Nevertheless, colony counts were significantly lower in animals that had received L-AmB 10 mg/kg/day for the first 4 days, plus 3 mg/kg/day until the end of treatment, than in controls (p 0.048).

DISCUSSION

The aim of this study was to determine whether initiating treatment for IPA with high doses of L-AmB and continuing with lower doses is a valid alternative to conventional regimens, i.e., administration of d-AmB 1 mg/kg/day or L-AmB 5 mg/kg/day. The initial dose of L-AmB was 10 mg/kg/day, which has been shown to yield the maximum plasma C_{max} , AUC_{24} and AUC_{∞} values in humans [9]. Experimental models of IPA using neutropenic and steroid-immunosuppressed rats have shown that this dosage is effective in increasing survival, reducing fungal load and pulmonary damage [6–8], and preventing fungal dissemination [7]. Administration of this dose was limited to a maximum of 4 days, based on a previous observation that use of this dose for ≥ 5 days in uninfected steroid-treated animals produces a drug interaction causing toxicity of unknown origin that contributes to the mortality, whereas lower doses do not have this effect [8]. Kisch *et al.* [18] reported in 1978 that co-administration of d-AmB and cortisone acetate produced renal lesions that were dose-related in severity, but there appears to be no similar information relating to L-AmB in the scientific literature.

The indications of the therapeutic efficacy of high loading doses of L-AmB were two-fold. First, in the steroid-immunosuppressed murine model of IPA, the use of d-AmB 1 mg/kg/day did not improve the outcome of the infection compared with the controls, whereas any of the studied regimens involving administration of L-AmB

achieved statistically significant differences in at least one of the four parameters examined compared with the controls. This is consistent with previous work, in which the efficacy of ≥ 5 mg/kg/day of L-AmB has been observed [8]. Equivalent improved efficacy of ≥ 5 mg/kg/day of L-AmB compared with the conventional formulation has been reported in animal models of invasive aspergillosis [6,7], although in humans, the superiority of relatively high doses of L-AmB (i.e., up to 4 mg/kg/day) over d-AmB (up to 1.5 mg/kg/day) is still a topic of debate [19] because of difficulties in design, development and comparison of clinical trials. Interpretation of results involving the use of L-AmB are complicated further by the reported substantial inter-patient differences in the handling of this drug [20].

Second, despite the absence of differences in outcome between the various L-AmB regimens used in this study, a slight trend towards better results was observed in groups receiving a combination of loading doses followed by low doses of L-AmB, with prolonged administration of high loading doses followed by lower doses resulting in significant differences in survival, reduction of lung weight and glucosamine content compared with d-AmB 1 mg/kg/day. This was in contrast with the results obtained with L-AmB 5 mg/kg/day, but is in keeping with the findings of Becker *et al.* [21], who showed an improvement in survival and pulmonary fungal load in a neutropenic rat model of IPA with the use of another type of intensive initial therapy involving the addition of d-AmB on the first day of therapy with high doses of L-AmB.

In contrast to the results for survival, lung weight and lung glucosamine content, CFU counts did not vary significantly between the treatment groups, with the exception indicated in Table 1. This may be because CFU counts do not represent the real viable fungal load, as larger hyphae represent a larger fungal load, but not necessarily a larger number of CFUs [6,21].

The use of initial high doses for treating IPA represents an aggressive approach to therapy for this infection, the importance of which has been noted previously [21–23]. Although no substantive differences were found between the outcomes with any of the L-AmB regimens in the present experimental model of IPA, a trend towards a slightly better outcome was seen with the higher loading dose. The clinical meaning of this

observation remains to be determined, and caution in interpreting this result is required until further studies are conducted. However, preliminary results from a non-comparative study have shown that a primary treatment period consisting of 5 days of L-AmB 10 mg/kg/day, followed by 9 days of L-AmB 3 mg/kg/day, yields an overall response rate (both partial and complete) of 60% in patients with proven or probable invasive fungal infection or chronic disseminated candidiasis (Annual Scientific Meeting of the British Society for Haematology, Cardiff, 2004, abstract 202). The present study was not designed to determine the exact duration of initial therapy with high doses, and the suggested approach to treatment of IPA with loading doses should be the subject of in-depth investigations in other models of experimental IPA.

In conclusion, the use of initial high loading doses appears to be a valid alternative to d-AmB 1 mg/kg/day in the steroid-immunosuppressed model of IPA, with an efficacy that is at least equivalent to that of L-AmB 5 mg/kg/day. The duration of the initial high doses cannot be deduced from the findings in this study, and further work is required on this subject.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS exp. no. 01/1412) and was presented, in part, at the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Diego, CA, USA, 2002). We thank C. Cavallo for English language assistance.

REFERENCES

- Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 781–805.
- Link H, Böhme A, Cornely OA *et al.* Antimicrobial therapy of unexplained fever in neutropenic patients. Guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO); Study Group Interventional Therapy of Unexplained Fever, Arbeitsgemeinschaft Supportivmassnahmen in der Onkologie (ASO) of the Deutsche Krebsgesellschaft (DKG-German Cancer Society). *Ann Hematol* 2003; **82**(suppl 2): 133–140.
- Denning DW, Kibler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003; **3**: 230–240.
- Gavaldà J, Ruiz I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección por *Aspergillus* spp. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2003; **21**: 571–578.
- Meunier F, Prentice HG, Ringden O. Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. *J Antimicrob Chemother* 1991; **28**(suppl B): 83–91.
- Francis P, Lee JW, Hoffman A *et al.* Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalveolar D-mannitol and serum galactomannan as markers of infection. *J Infect Dis* 1994; **169**: 356–368.
- Leenders AC, de Marie S, ten Kate MT, Bakker-Woudenberg IA, Verbrugh HA. Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 1996; **38**: 215–225.
- Martín MT, Gavaldà J, López P *et al.* Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1032–1034.
- Walsh TJ, Goodman JL, Pappas P *et al.* Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 3487–3496.
- de Marie S, Janknegt R, Bakker-Woudenberg AJM. Clinical use of liposomal and lipid-complexed amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 1994; **33**: 907–916.
- Walsh TJ, Yeldandi V, McEvoy M *et al.* Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2391–2398.
- Adler-Moore JP, Olson JA, Proffitt RT. Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (AmBisome) effective in treating murine systemic candidiasis. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 1096–1102.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: proposed standard*. Document M-38P. Wayne, PA: NCCLS, 1998.
- Niki Y, Bemard EM, Edwards FF, Schmitt HJ, Yu B, Armstrong D. Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 1317–1322.
- Fluckiger U, Francioli P, Blaser J, Glauser MP, Moreillon P. Role of amoxicillin serum levels for successful prophylaxis of experimental endocarditis due to tolerant streptococci. *J Infect Dis* 1994; **169**: 1397–1400.
- Lehmann PF, White LO. Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect Immun* 1975; **12**: 987–992.
- Plassard C. Assay of fungal chitin and estimation of mycelial biomass. In: Muzzarelli RAA, Peter MG, eds. *Chitin handbook*. Grottammare: Atec Edizioni, 1997; 27–31.
- Kisch AL, Maydew RP, Evan AP. Synergistic nephrotoxicity of amphotericin B and cortisone acetate in mice. *J Infect Dis* 1978; **137**: 789–794.
- Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis* 1998; **27**: 603–618.
- Heinemann V, Bosse D, Jehn U *et al.* Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (AmBisome) in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 1275–1280.

1004 *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 11 Number 12, December 2005

21. Becker MJ, de Marie S, Fens MH, Hop WC, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Enhanced antifungal efficacy in experimental invasive pulmonary aspergillosis by combination of AmBisome with Fungizone as assessed by several parameters of antifungal response. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 813–820.
22. Stevens DA, Kan VL, Judson MA *et al.* Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis* 2000; **30**: 696–709.
23. Mehrad B, Paciocco G, Martinez FJ, Ojo TC, Iannettoni MD, Lynch JP. Spectrum of *Aspergillus* infection in lung transplant recipients. *Chest* 2001; **119**: 169–175.

2.5. ESTUDIO 3.

“Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis”.

Joan Gavaldà, María-Teresa Martín, Pedro López, Xavier Gomis, José-Luís Ramírez, Dolors Rodríguez, Óscar Len, Yolanda Puigfel, Isabel Ruiz y Albert Pahissa.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2005) **49**: 3028-3030.

2.5.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO DEL ESTUDIO 3.

La eficacia terapéutica de la anfotericina B liposomal en la aspergilosis pulmonar experimental aumenta cuando se incrementa la cantidad de anfotericina B disponible en el foco de infección. La administración de la anfotericina B liposomal por vía inhalatoria en forma de nebulizado consigue incrementar la cantidad de anfotericina B que llega directamente al pulmón. Ya que no es absorbida en cantidades significativas, la administración en forma nebulizada de anfotericina B permite alcanzar concentraciones elevadas del fármaco en el foco primario de la infección, el pulmón, a la vez que se evitan los efectos indeseables asociados al tratamiento sistémico con este antifúngico.

2.5.2. OBJETIVOS CONCRETOS DEL ESTUDIO 3.

- 1°. Evaluar la eficacia terapéutica de la anfotericina B deoxicolato administrada por vía inhalatoria.
- 2°. Evaluar la eficacia terapéutica de la anfotericina B liposomal administrada por vía inhalatoria.
- 3°. Evaluar la eficacia terapéutica de la administración combinada de anfotericina B liposomal por vía inhalatoria e intravenosa.

Efficacy of Nebulized Liposomal Amphotericin B in Treatment of Experimental Pulmonary Aspergillosis

Joan Gavalda,* María-Teresa Martín, Pedro López, Xavier Gomis, José-Luís Ramírez, Dolores Rodríguez, Oscar Len, Yolanda Puigfel, Isabel Ruíz, and Albert Pahissa

Infectious Diseases Research Laboratory, Infectious Diseases Division, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 21 December 2004/Returned for modification 21 January 2005/Accepted 30 March 2005

The efficacy of therapeutic aerosolized amphotericin B (AMB) was studied in a steroid-immunosuppressed murine model of invasive pulmonary aspergillosis. Nebulized liposomal AMB can be a valid approach to the treatment of this infection, with subjects showing significantly improved survival relative to that of subjects given intravenous deoxycholate AMB, as well as lower lung weights and pulmonary glucosamine levels.

Pulmonary disease is the most frequent form of invasive aspergillosis (4), a fungal infection of growing incidence among immunocompromised patients (4), chiefly caused by *Aspergillus fumigatus* and associated with high mortality rates (10), despite a therapeutic arsenal that has been broadened with the approval of new drugs (5, 7, 15). To improve the poor results obtained with current treatment regimens, the potential usefulness of methods which may increase the concentration of amphotericin B (AMB) at the infectious focus, including its use by nebulization, has been suggested (8, 16, 19).

The efficacy of nebulized deoxycholate AMB or liposomal AMB was compared to that of conventional intravenous (i.v.) dosages of both formulations, using a murine model of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). The potential benefits of inhalation plus i.v. administration were also explored. This experimental protocol was approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron Hospitals.

Female Wistar rats (180 to 200 g; Harland Iberica, Spain), fed with a low-protein diet, were immunosuppressed with 125 mg of subcutaneous cortisone acetate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) per kg of body weight three times per week, from 14 days before infection to the end of the experiment (11).

On day 0, animals were intratracheally challenged with 0.3 ml of a conidial suspension prepared from a 1-week-old subculture on Sabouraud dextrose agar of a clinical isolate of *A. fumigatus* (AF19/68). Conidia were counted in a hemocytometer and adjusted to 8×10^6 cells/ml in sterile saline.

Intravenous treatments were administered through a central venous catheter (11). Aerosols were generated by a CR60 compressor (Medic-Aid Ltd., West Sussex, United Kingdom; flow rate, 10 liter/min) attached to a Nebulizer II Oxinova (Carburros Metálicos, Barcelona, Spain) and were led through a nose-only exposure inhalation chamber (Panlab, Spain) over a 60-min period. The total dosage of AMB administered to each animal was calculated with the following formula: the total dosage = the chamber concentration of AMB (mg/liter)

\times the minute volume (liter/min) \times the duration of exposition (min) \times the animal's weight (kg^{-1}) (1). The minute volume is equal to the body weight^{0.75} (grams) \times 0.00254 (6).

Animals were randomized to receive 5% dextrose i.v. (control) ($n = 23$), deoxycholate AMB (d-AMB) at 1 mg/kg i.v. (Fungizone; Bristol-Myers Squibb Group, Spain) ($n = 25$), liposomal AMB (L-AMB) at 5 mg/kg i.v. (AmBisome; Gilead Sciences, Spain) ($n = 27$), nebulized d-AMB (nd-AMB) at 1.13 mg/kg ($n = 18$), nebulized L-AMB (nL-AMB) at 2.3 mg/kg ($n = 16$), or nL-AMB at 2.3 mg/kg plus L-AMB at 5 mg/kg i.v. ($n = 16$). Treatment was administered daily, starting 24 h after infection, for a total of 10 days.

Surviving rats were sacrificed 24 h after the last dose of treatment. All animals were aseptically dissected. Lungs were weighed and homogenized in sterile distilled water, and aliquots were serially diluted and plated onto Sabouraud dextrose agar for colony counts. Lung homogenates were processed for chitin assay, as described elsewhere (9), to quantify fungal burden. In brief, homogenates were suspended in 21.4 M KOH after being washed with 0.10 M sodium dodecyl sulfate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and heated at 130°C for 1 h. After cooling, 8 ml of 75% ethanol and 0.3 ml of a Celite 545 suspension (Sigma) were added. Pellets were washed with 40% ethanol and distilled water and suspended in 0.5 ml of 0.7 M NaNO₂ and 0.5 ml of 0.4 M KHSO₄. Volumes of the supernatants were mixed with 1.10 M ammonium sulfamate, followed by 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride hydrate monohydrate (Sigma) and 0.03 M FeCl₃ · 6H₂O. The optical density was spectrophotometrically read (UV-160A; Shimadzu Corp., Japan) at 650 nm.

Survival was analyzed using Kaplan-Meier analysis and the log rank test. Lung weight (grams), chitin content (micrograms of glucosamine/paired lungs), and numbers of CFU/gram of lung (log₁₀ numbers of CFU/gram) were expressed as means and 95% confidence intervals of the means and compared using one-way analysis of variance and Bonferroni's test. *P* values of ≤ 0.01 were considered significant.

Results obtained from animals surviving 5 days or longer with the treatment are shown in Table 1 and Fig. 1 and 2. Results were pooled, since preliminary studies revealed that pulmonary glucosamine reaches a plateau by this time in ani-

* Corresponding author. Mailing address: Servei de Malalties Infeccioses, Hospital General Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-4894033. Fax: 34-93-2746057. E-mail: jgavalda@vhebron.net.

TABLE 1. Therapeutic efficacy in the treatment groups

Group	No. of rats	Value for rats surviving ≥ 5 days of treatment ^b			
		No. of rats (% of total)	Wt of paired lungs (g) ^a	Amt of glucosamine/paired lungs (μg) ^a	Log ₁₀ no. of CFU/g ^a
Control	23	11 (47.83)	3.15 (2.63–3.68)	176.25 (117.06–237.44)	5.08 (4.53–5.63)
d-AMB at 1 mg/kg/day, i.v.	25	17 (68)	2.97 (2.61–3.33)	148.36 (96.37–200.35)	5.07 (4.83–5.30)
L-AMB at 5 mg/kg/day, i.v.	27	19 (70.37)	2.37 (2.06–2.68)*	78.26 (31.30–125.22)	4.99 (4.75–5.24)
nd-AMB at 1.13 mg/kg/day	18	15 (83.33)	2.26 (1.94–2.58)*†	97.89 (40.18–155.60)	4.56 (4.14–4.97)
nL-AMB at 2.3 mg/kg/day	16	14 (87.5)	1.87 (1.60–2.14)*†	28.31 (5.34–51.29)*†	4.48 (3.80–5.17)
nL-AMB + L-AMB, i.v.	16	16 (100)	1.82 (1.59–2.05)*†	46.28 (10.58–81.97)*	4.30 (3.89–4.70)

^a Results are expressed as means \pm 95% confidence intervals. *, $P \leq 0.01$ versus value for control; †, $P \leq 0.01$ versus value for d-AMB administered i.v. at 1 mg/kg/day.

^b Values are the results of three experiments combined.

mals left untreated (J. Gavaldà, P. López, T. Martín, X. Gomis, M. Rosal, B. Almirante, C. Pigrau, and A. Pahissa, Abstr. 40th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1682, 2000).

Nebulized d-AMB improved survival ($P = 0.019$) and lung weight ($P = 0.006$) compared to those of controls, whereas the nL-AMB group showed significantly improved survival, pulmonary weights, and glucosamine levels compared to control and i.v. d-AMB groups ($P \leq 0.003$); compared to the i.v. L-AMB group, the survival of animals receiving nL-AMB was prolonged, reaching levels close to significance ($P = 0.066$).

Aerosolization plus i.v. administration of L-AMB produced results similar to those with nL-AMB alone compared with the control. Compared to results with i.v. d-AMB, an important reduction of glucosamine was noted ($P = 0.016$), although the combined administration achieved the most remarkable diminution of log₁₀ numbers of CFU ($P = 0.071$, versus i.v. d-AMB results). Discrepancies between CFU counts and chitin mea-

surements have been previously reported, due to the peculiar structure of molds (2).

Pulmonary concentrations achieved with recommended doses (up to 5 mg/kg/day) of L-AMB can be considered supra-inhibitory according to in vitro data, but in vivo, they might be insufficient to eradicate the fungus. Therefore, pulmonary AMB concentrations could be increased by nebulization. Experimental animal studies have shown that aerosolization leads to measurable concentrations of AMB in lungs (1, 14, 16), and levels have been reported to be higher with lipid formulations (1, 3). Nebulization minimizes the risk of adverse events by avoiding systemic exposure to the drug (16, 18), focusing the drug activity at the site of infection.

The efficacy of aerosol AMB prophylaxis against *Aspergillus* infection has been extensively studied. Experimental models of IPA have shown that nebulized AMB increases survival with respect to that of controls (1, 3, 18), and it has also been

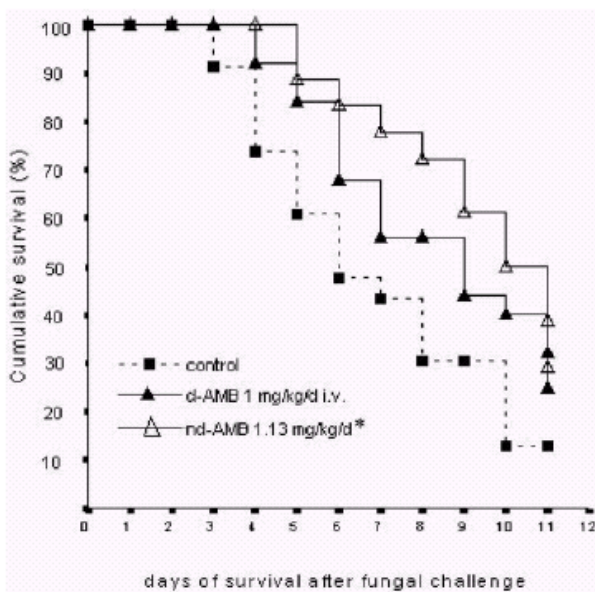


FIG. 1. Effects of administration of nebulized d-AMB versus intravenous administration of d-AMB in steroid-immunosuppressed rats with experimental invasive aspergillosis. *, significant relative to value for control.

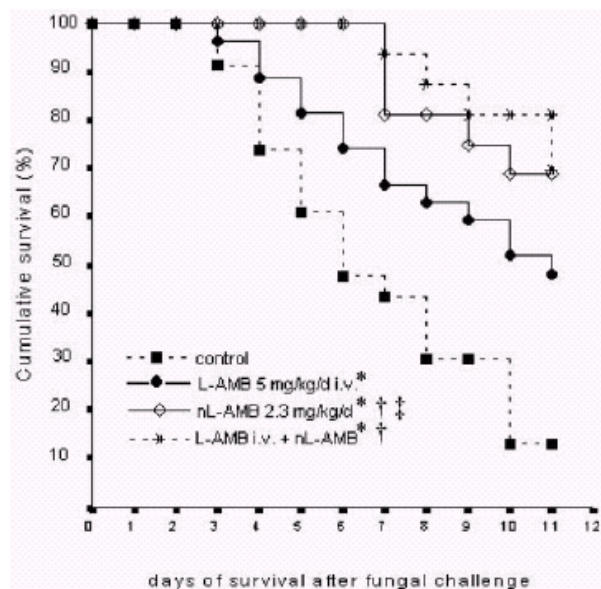


FIG. 2. Effects of administration of nebulized L-AMB versus intravenous administration of L-AMB in steroid-immunosuppressed rats with experimental invasive aspergillosis. *, significant relative to value for control; †, significant relative to value for i.v. d-AMB; ‡, significant relative to value for nd-AMB.

described as a protective factor against *Aspergillus* species infection in lung transplant recipients (12, 13). In contrast, few studies have investigated the efficacy of nebulized AMB for the treatment of IPA (17, 18). Nebulized L-AMB has proved to be useful for the treatment of experimental invasive aspergillosis of neutropenic rats (17). In humans, Ruffini and coworkers (E. Ruffini, S. Baldi, D. Libertucci, P. Solidoro, P. di Marzio, A. Cavallo, and M. Mancuso, Abstr. 42nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. M-1237, 2002) have reported that nL-AMB alone resolved nine episodes of colonization, and in association with L-AMB i.v., it resolved all four cases of invasive aspergillosis.

Our work shows that aerosolization of AMB is a useful approach to the treatment of experimental IPA, with a more favorable outcome achieved with nL-AMB than with nd-AMB. This may suggest that both nd-AMB and nL-AMB reached satisfactory concentrations in the lungs, although concentrations were probably slightly higher with the liposomal formulation.

Combined administration of nebulized plus i.v. L-AMB produced results similar to those with nL-AMB alone, probably because the two methods rendered little difference in pulmonary concentrations of AMB. Being outside the scope of the study, we did not investigate whether the combination prevented the risk of extrapulmonary dissemination. Since in humans dissemination is difficult to discard, administering aerosolized plus i.v. L-AMB seems prudent.

We conclude that the use of nebulized AMB, in particular L-AMB, may be a useful approach to the treatment of experimental IPA. Further studies might be warranted.

We thank Celine Cavallo for English language assistance.

This work has been supported by the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (grants FIS 01/1412 and FIS G03/075 RESITRA).

REFERENCES

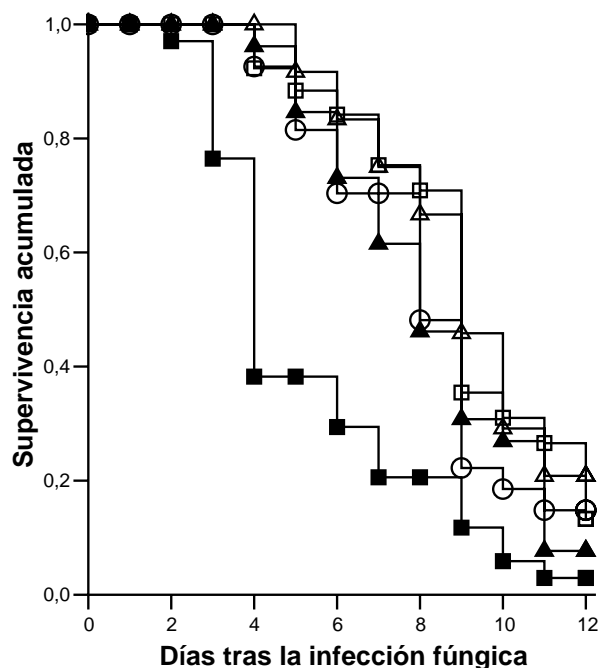
- Allen, S. D., K. N. Sorensen, M. J. Nejdil, C. Durrant, and R. T. Proffit. 1994. Prophylactic efficacy of aerosolized liposomal (AmBisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine pulmonary aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**:1001–1013.
- Becker, M. J., S. de Marie, M. H. Fens, W. C. Hop, H. A. Verbrugh, and I. A. Bakker-Woudenberg. 2002. Enhanced antifungal efficacy in experimental invasive pulmonary aspergillosis by combination of AmBisome with Fungizone as assessed by several parameters of antifungal response. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:813–820.
- Cicogna, C. E., M. H. White, E. M. Bernard, T. Ishimura, M. Sun, W. P. Tong, and D. Armstrong. 1997. Efficacy of prophylactic aerosol amphotericin B lipid complex in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:259–261.
- Denning, D. W. 1998. Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **26**:781–805.
- Denning, D. W., C. C. Kibler, and R. A. Barnes on behalf of the British Society for Medical Mycology. 2003. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect. Dis.* **3**:230–240.
- Guyton, A. C. 1947. Measurement of respiratory volumes of laboratory animals. *Am. J. Physiol.* **150**:70–77.
- Herbrecht, R., D. W. Denning, T. F. Patterson, J. E. Bennett, R. E. Greene, J. W. Oestmann, W. V. Kern, K. A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. H. Rubin, J. R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P. H. Chandrasekar, M. R. Hodges, H. T. Schlämm, P. F. Troke, and B. de Pauw, for the Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study Group. 2002. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* **347**:408–415.
- Koizumi, T., K. Kubo, T. Kaneki, M. Hanaoka, T. Hayano, T. Miyahara, K. Okada, K. Fujimoto, H. Yamamoto, T. Kobayashi, and M. Sekiguchi. 1998. Pharmacokinetic evaluation of amphotericin B in lung tissue: lung lymph distribution after intravenous injection and airspace distribution after aerosolization and inhalation of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1597–1600.
- Lehmann, P. F., and L. O. White. 1975. Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect. Immun.* **12**:987–992.
- Lin, S.-J., J. Schranz, and S. Teutsch. 2001. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **32**:358–366.
- Martin, M. T., J. Gavaldà, P. López, X. Gomis, J. L. Ramirez, D. Rodriguez, O. Len, Q. Jordano, I. Ruiz, M. Rosal, B. Almirante, and A. Pahissa. 2003. Efficacy of high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:1032–1034.
- Minari, A., R. Husni, R. K. Avery, D. L. Longworth, M. DeCamp, M. Bertin, R. Schilz, N. Smedira, M. T. Haug, A. Mehta, and S. M. Gordon. 2002. The incidence of invasive aspergillosis among solid organ transplant recipients and implications for prophylaxis in lung transplants. *Transpl. Infect. Dis.* **4**:195–200.
- Monforte, V., A. Román, J. Gavaldà, C. Bravo, L. Tenorio, A. Ferrer, J. Maestre, and F. Morell. 2001. Nebulized amphotericin B prophylaxis for *Aspergillus* infection in lung transplantation: study of risk factors. *J. Heart Lung Transplant.* **20**:1274–1281.
- Niki, Y., E. M. Bernard, H.-J. Schmitt, W. P. Tong, F. F. Edwards, and D. Armstrong. 1990. Pharmacokinetics of aerosol amphotericin B in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:29–32.
- Ostrosky-Zeichner, L., K. A. Marr, J. H. Rex, and S. H. Cohen. 2003. Amphotericin B: time for a new “gold standard.” *Clin. Infect. Dis.* **37**:415–425.
- Ruijgrok, E. J., A. G. Vulto, and E. W. M. Van Etten. 2000. Aerosol delivery of amphotericin B desoxycholate (Fungizone) and liposomal amphotericin B (AmBisome): aerosol characteristics and in-vivo amphotericin B deposition in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**:619–627.
- Ruijgrok, E. J., A. G. Vulto, and E. W. M. Van Etten. 2001. Efficacy of aerosolized amphotericin B desoxycholate and liposomal amphotericin B in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in severely immunocompromised rats. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:89–95.
- Schmitt, H. J., E. M. Bernard, M. Häuser, and D. Armstrong. 1988. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1676–1679.
- Steinbach, W. J., and D. A. Stevens. 2003. Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **37**(Suppl. 3):157–187.

3. RESULTADOS

3.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO 1.

La supervivencia media de los animales tratados con antifúngico se incrementó significativamente con respecto a la de los controles no tratados ($p \leq 0.0015$), como se refleja en la figura 1 y la tabla 1. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento, no se pudo hacer un análisis estadístico exhaustivo de los datos de supervivencia, ya que en los estudios de toxicidad se observó en algunos grupos de animales una mortalidad aparentemente relacionada con el tratamiento, como se explica más adelante.

Figura 1: Efecto de d-AMB comparado con el de diferentes dosis de L-AMB o con el control no tratado en la supervivencia acumulada de las ratas con aspergilosis pulmonar invasora.



(■): control; (▲): d-AMB 1 mg/kg/día; (□): L-AMB 3 mg/kg/día; (△): L-AMB 5 mg/kg/día; (○): L-AMB 10 mg/kg/día.

En aquellos animales que pudieron recibir al menos 5 días de tratamiento se registraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en los otros parámetros estudiados. El peso

medio del bloque pulmonar, que indica de forma indirecta el daño tisular provocado por el hongo, presentó valores significativamente inferiores en los grupos tratados con 5 o 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal comparados con los del grupo control ($p = 0.004$ y 0.001 respectivamente) o con el grupo que recibió 3 mg/kg/día de anfotericina B liposomal ($p = 0.007$ y 0.002 respectivamente). También se encontraron diferencias en cuanto a la masa fúngica de los pulmones. Se observó una relación inversa entre el contenido en quitina (expresado en microgramos de glucosamina) del bloque pulmonar y la dosis administrada de anfotericina B de manera que fue significativamente menor en el grupo que recibió 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal que en los grupos control ($p = 0.003$), anfotericina B deoxicolato 1 mg/kg/día ($p = 0,007$) y anfotericina B liposomal 3 mg/kg/día ($p = 0.001$).

En cuanto a los estudios de toxicidad, no se encontraron signos de efectos adversos en los animales no infectados ni inmunosuprimidos pero tratados con anfotericina B, deoxicolato o liposomal. Por el contrario, sí se produjeron muertes entre los animales inmunosuprimidos no infectados que fueron tratados durante al menos 4 días con 1 mg/kg/día de anfotericina B deoxicolato (37.5% de los animales), o con anfotericina B liposomal a dosis de 5 mg/kg/día (28,6% de los animales) o 10 mg/kg/día (50% de los animales). Los parámetros analíticos investigados en la sangre de los animales al final del experimento no aportaron suficientes datos como para esclarecer el origen de esta toxicidad relacionada con el tratamiento.

Tabla 1. Resultados de la eficacia terapéutica de los diferentes grupos de tratamiento.

	N° total de ratas	Días de supervivencia ^a	Ratas que sobreviven ≥ 5 días de tratamiento			
			N° de animales (% del total)	Log ₁₀ de UFC/gramo de tejido pulmonar ^b	Peso del bloque pulmonar (gramos) ^b	Log ₁₀ microgramos de glucosamina / bloque pulmonar ^b
Control	34	4.44 ± 2.79	11 (32.4)	2.85 (1.08-4.61)	2.59 (2.22-2.96)	2.18 (1.95-2.42)
d-AMB 1 mg/kg/día	26	7.35 ± 2.51 [†]	20 (76.9)	2.75 (2.37-3.14)	2.04 (1.67-2.41)	2.06 (1.85-2.26)
L-AMB 3 mg/kg/día	26	7.69 ± 2.80 [†]	19 (73.1)	3.82 (3.33-4.31)	2.40 (1.95-2.86)	2.14 (1.92-2.36)
L-AMB 5 mg/kg/día	24	8.33 ± 2.55 [†]	20 (83.3)	3.07 (2.38-3.75)	1.64 (1.38-1.90) [†] ¶	1.88 (1.74-2.01)
L-AMB 10 mg/kg/día	27	7.33 ± 2.69 [†]	19 (70.4)	2.51 (2.05-2.97) [¶]	1.52 (1.28-1.77) [†] ¶	1.59 (1.35-1.83) [†] ¶ ¶

^aDatos expresados como media ± desviación estándar.

^bDatos expresados como media (intervalo de confianza 95%).

[†] $P < 0.015$ comparado con control.

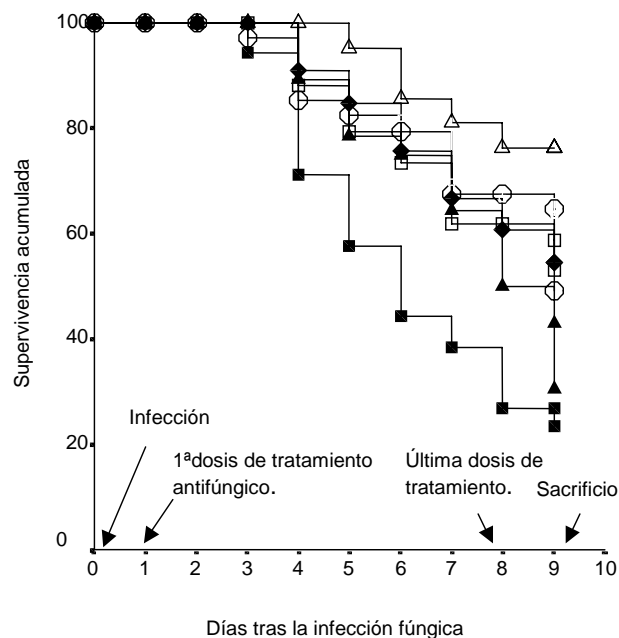
[‡] $P < 0.015$ comparado con d-AMB 1 mg/kg/día.

[¶] $P < 0.015$ comparado con L-AMB 3 mg/kg/día.

3.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO 2.

La figura 2 y la tabla 2 resumen los resultados obtenidos en este grupo de experimentos. La supervivencia de los grupos que recibieron tratamiento antifúngico fue superior a la del grupo control, pero la diferencia sólo fue estadísticamente significativa en el caso de los grupos que recibieron anfotericina B liposomal ($p \leq 0,003$). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre de los grupos que recibieron anfotericina B liposomal, sólo la supervivencia de los animales que recibieron la pauta de anfotericina B liposomal de 10 mg/kg durante 4 días seguido de 3 mg/kg hasta el fin del experimento fue estadísticamente mayor que la de los animales que fueron tratados con anfotericina B deoxicolato ($p = 0,009$).

Figura 2: Efecto de d-AMB comparado con L-AMB o control no tratado en la supervivencia acumulada de las ratas con aspergilosis pulmonar invasora.



(■): control; (▲): d-AMB 1 mg/kg/día; (◆): L-AMB 5 mg/kg/día; (□): L-AMB 10 mg/kg 3 días; (○): L-AMB 10 mg/kg 3 días seguidos de L-AMB 3 mg/kg/día; (△): L-AMB 10 mg/kg 4 días seguido de L-AMB 3 mg/kg/día.

En consonancia con los resultados de supervivencia, el peso del bloque pulmonar de los grupos que fueron tratados al menos 5 días con anfotericina B liposomal fue significativamente inferior al del grupo control ($p \leq 0,001$). No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes pautas de administración de la anfotericina B liposomal en lo que respecta al peso del bloque pulmonar, aunque el de los animales que recibieron 10 mg/kg de anfotericina B liposomal 3 o 4 días seguido de 3 mg/kg fue significativamente menor que el de los que recibieron anfotericina B deoxicolato ($p = 0,016$ y $0,009$ respectivamente).

Comparada con la del grupo control, la cantidad de quitina detectada en el tejido pulmonar también fue menor en los animales que recibieron tratamiento antifúngico, aunque la diferencia sólo fue estadísticamente significativa en el caso de los grupos tratados con anfotericina B liposomal a dosis de 10 mg/kg 3 o 4 días seguidos de 3 mg/kg/día ($p = 0,020$ y $0,009$ respectivamente) y sólo en el grupo que recibió 10 mg/kg durante 4 días de anfotericina B liposomal seguido de 3 mg/kg/día se observó una reducción significativa del contenido de quitina pulmonar respecto al grupo tratado con anfotericina B deoxicolato ($p = 0,028$).

En lo que respecta al recuento de UFC por gramo de tejido pulmonar, los resultados fueron similares entre casi todos los grupos, aunque los del grupo al que se administraron 10 mg/kg de anfotericina B liposomal 4 días seguido de 3 mg/kg/día fueron significativamente menores que los del grupo control ($p = 0,048$).

Tabla 2: Resultados de la eficacia terapéutica de los diferentes grupos.

	Nº total ^a	Supervivencia ^b	Animales que sobreviven ≥ 5 días de tratamiento			
			n (% del total) ^c	Peso bloque pulmonar ^{b,d}	Log ₁₀ µg glucosamina ^{b,e}	Log ₁₀ UFC/gramo ^{b,f}
Control	52	5.60 (4.90-6.26)	23 (44.23)	2.87 (2.42-3.31)	2.11 (1.87-2.35)	5.40 (5.17-5.62)
d-AMB 1 mg/kg/d	28	7.00 (6.14-7.86)	21 (75)	2.30 (1.91-2.69)	2.06 (1.82-2.30)	5.19 (4.93-5.44)
L-AMB 5 mg/kg/d	33	7.33 (6.56-8.10)*	25 (75.76)	1.88 (1.61-2.15)	1.88 (1.61-2.15)	5.22 (5.01-5.44)
L-AMB 10 mg/kg 3 días	34	7.24 (6.61-8.27)*	25 (73.53)	1.97 (1.69-2.24)	1.97 (1.69-2.24)	5.22 (4.94-5.51)
L-AMB 10 mg/kg 3 días+3 mg/kg/d	34	7.44 (6.61-8.27)*	27 (79.41)	1.74 (1.49-1.99)*	1.74 (1.49-1.99)*	5.18 (4.99-5.37)
L-AMB 10 mg/kg 4 días+3 mg/kg/d	21	8.14 (7.39-8.89)* †	18 (85.71)	1.59 (1.29-1.90)* †	1.59 (1.29-1.90)* †	5.02 (4.74-5.31)*

^a: Número total (N) de animales incluidos en cada grupo.

^b: Resultados expresados como media (intervalo de confianza 95%).

^c: Número de supervivientes (n) tras un mínimo de 5 dosis de tratamiento (Porcentaje del número total de animales).

^d: Peso del bloque pulmonary en gramos.

^e: Log₁₀ microgramos de glucosamina por bloque pulmonary

^f: Log₁₀ UFC por gramo de tejido pulmonar.

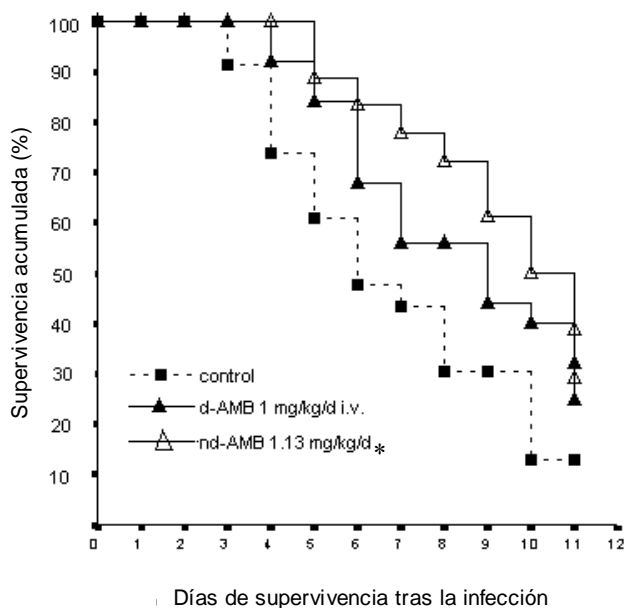
* $P \leq 0.05$ respecto al control

† $P \leq 0.05$ respecto a d-AMB 1 mg/kg/día.

3.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO 3.

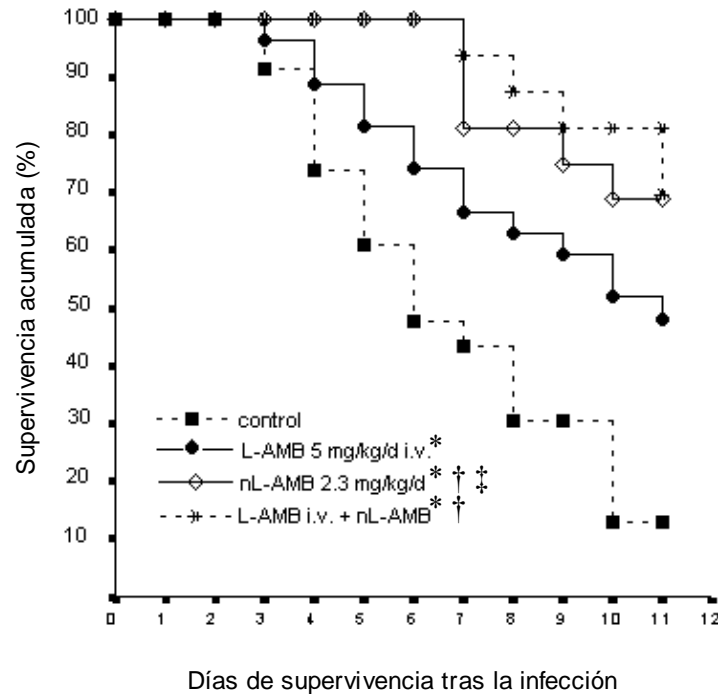
La administración en forma de nebulizado de la anfotericina B deoxicolato consiguió incrementar significativamente la supervivencia ($p = 0.019$) y reducir el peso del bloque pulmonar ($p = 0.006$) en comparación con los resultados del grupo control, como queda reflejado en la tabla 3 y las figuras 3 y 4. Por su parte, la administración en forma de aerosol de la anfotericina B liposomal resultó en diferencias significativas en cuanto a la prolongación de la supervivencia, la reducción del peso pulmonar y el contenido de quitina no sólo respecto al grupo control ($p \leq 0.001$), sino también respecto a al grupo que recibió anfotericina B deoxicolato por vía intravenosa ($p \leq 0,003$). La supervivencia de los animales que recibieron anfotericina B liposomal nebulizada también fue mayor que la de los que recibieron esta formulación por vía intravenosa, alcanzando valores próximos a la significación estadística ($p = 0.066$).

Figura 3: Efecto de la administración de anfotericina B deoxicolato nebulizada (nd-AmB) e intravenosa (d-AmB) en ratas con aspergilosis pulmonar experimental inmunosuprimidas con esteroides



*: significativo respecto a control

Figura 4: Efecto de la administración de anfotericina B liposomal intravenosa (L-AMB) y nebulizada (nL-AMB) en ratas con aspergilosis pulmonar experimental inmunosuprimidas con esteroides



*Significativo respecto a control; †: Significativo respecto a d-AMB intravenoso; ‡: significativo respecto a nd-AMB.

Los resultados obtenidos de los animales en los que se combinó la administración intravenosa y nebulizada de anfotericina B liposomal fueron similares a los del grupo que recibió sólo anfotericina B liposomal nebulizada en comparación con los del grupo control (supervivencia $p \leq 0,0003$, peso pulmonar y contenido de quitina $p \leq 0,01$) aunque fue la administración combinada de anfotericina B liposomal la que consiguió la reducción del número de colonias más destacable ($p = 0.071$ respecto a 1 mg/kg/día de anfotericina B deoxicolato por intravenosa).

Tabla 3: Eficacia terapéutica en los grupos de tratamiento.Valores obtenidos en ratas que sobrevivieron ≥ 5 días de tratamiento^b.

GRUPO	N° de	N° de ratas	Peso del bloque	Glucosamina/bloque	Log ₁₀ UFC/gram ^a
	ratas	(% del total)	pulmonar (gramos) ^a	pulmonar (microgramos) ^a	
Control	23	11 (47.83)	3.15 (2.63-3.68)	176.25 (117.06-237.44)	5.08 (4.53-5.63)
d-AMB 1 mg/kg/día i.v.	25	17 (68)	2.97 (2.61-3.33)	148.36 (96.37-200.35)	5.07 (4.83-5.30)
L-AMB 5 mg/kg/día i.v.	27	19 (70.37)	2.37 (2.06-2.68)*	78.26 (31.30-125.22)	4.99 (4.75-5.24)
nd-AMB 1.13 mg/kg/día	18	15 (83.33)	2.26 (1.94-2.58)*†	97.89 (40.18-155.60)	4.56 (4.14-4.97)
nL-AMB 2.3 mg/kg/día	16	14 (87.5)	1.87 (1.60-2.14)*†	28.31 (5.34-51.29)*†	4.48 (3.80-5.17)
nLAMB + LAMB i.v.	16	16 (100)	1.82 (1.59-2.05)*†	46.28 (10.58-81.97)*	4.30 (3.89-4.70)

^a Resultados expresados como media \pm intervalo de confianza 95%.^b Los valores expresan los resultados de 3 experimentos combinados.* $P \leq 0.01$ versus control† $P \leq 0.01$ versus d-AMB i.v. 1 mg/kg/d

4. DISCUSIÓN

4.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO 1.

En este estudio se comparó la eficacia de dosis convencionales de anfotericina B deoxicolato y de diferentes dosis de anfotericina B liposomal en el modelo experimental de aspergilosis pulmonar invasora con objeto de determinar si la administración de dosis de hasta 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal conseguía mejoras en cuanto a su eficacia terapéutica.

La falta de diferencias en la supervivencia de los distintos grupos estudiados parece relacionada con el hecho de que la coadministración persistente de glucocorticoides y anfotericina B, especialmente a dosis altas, causó la muerte de ratas no infectadas en los experimentos de toxicidad. La naturaleza de esta posible toxicidad cruzada no pudo ser aclarada mediante las determinaciones analíticas efectuadas. En ratones se ha descrito que la combinación de esteroides y anfotericina B deoxicolato produce efectos deletéreos (144), pero hasta el momento no se ha descrito en humanos ninguna interacción entre los esteroides y anfotericina B liposomal.

Como consecuencia de lo anterior, la supervivencia no pudo utilizarse para evaluar la eficacia terapéutica de los tratamientos estudiados. Así pues se recurrió a la comparación de otros parámetros como el peso del bloque pulmonar o la biomasa fúngica contenida en los pulmones de los animales. En lo que respecta al \log_{10} UFC/g de pulmón, sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con 3 y 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal ($p = 0.012$). Es posible que no se detectaran más diferencias entre los grupos de tratamiento por el hecho de que tanto las conidias solas o en grupos como los fragmentos de hifas, independientemente de su tamaño, pueden

originar una sola colonia cuando se siembran en un medio de cultivo. Ya que no ha sido definida la “unidad formadora de colonias” en el caso de los hongos filamentosos, es muy probable que el recuento de UFC no refleje de manera precisa la biomasa fúngica viable presente en una muestra y que este parámetro no sea fiable a la hora de estimar la carga fúngica tisular, como ya ha sido sugerido por otros autores previamente (104). Para evitar este problema se ha propuesto la cuantificación de elementos contenidos en las células fúngicas como método capaz de reflejar con más precisión la carga fúngica presente en un determinado tejido (122). En este sentido, se utilizó la cuantificación de quitina, un β 1-4 glucano presente en la pared fúngica que aumenta a medida que las hifas crecen, para comparar la reducción de la carga de *Aspergillus* en los pulmones de las ratas asignadas a los diferentes grupos de tratamiento. Al comparar los resultados de las determinaciones de quitina se detectaron diferencias significativas entre el grupo tratado con 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal y los grupos control, anfotericina B deoxicolato y anfotericina B liposomal 3 mg/kg/día y una tendencia, aunque no significativa, a la reducción de la carga fúngica en el grupo que recibió 5 mg/kg/día de anfotericina B liposomal, y estos resultados concordaron con los obtenidos cuando se utilizó el peso del bloque pulmonar para evaluar la eficacia terapéutica.

Aunque es difícil establecer comparaciones debido a las diferencias entre los modelos animales y los parámetros estudiados, nuestros resultados son coherentes con los publicados previamente por otros autores que utilizaron modelos de aspergilosis en animales neutropénicos. Así, Leenders y colaboradores, en un modelo murino de aspergilosis pulmonar experimental en el que sólo se infecta un pulmón, encontraron que tanto 1 mg/kg/día de

anfotericina B deoxicolato como 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal retrasaban la mortalidad e incrementaban significativamente la supervivencia de los animales tratados en comparación con los controles no tratados, aunque sólo anfotericina B liposomal 10 mg/kg/día reducía la diseminación de la infección al pulmón contralateral y evitaba por completo la diseminación extrapulmonar de *Aspergillus* en ratas neutropénicas (95). De la misma manera, Francis y colaboradores mostraron que dosis de 5 mg/kg/día o superiores de anfotericina B liposomal eran capaces de prolongar la supervivencia y de reducir el daño pulmonar en conejos neutropénicos (96).

En resumen, en este estudio la administración diaria de anfotericina B liposomal a dosis elevadas, de 10 mg/kg/día, fue más eficaz que las pautas de tratamiento que utilizaron dosis más bajas de anfotericina B liposomal o que 1 mg/kg/día de anfotericina B deoxicolato al reducir la carga fúngica de los pulmones expresada como contenido de quitina en este tejido. La actividad antifúngica dependiente de dosis de anfotericina B liposomal podría ser de crucial importancia en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar en pacientes inmunodeprimidos. La administración de 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal podría ser de utilidad en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar aunque serían necesarios más estudios antes de trasladar esta estrategia terapéutica a la clínica humana.

4.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO 2.

En este estudio se investigó si iniciar el tratamiento de la aspergilosis pulmonar experimental con dosis elevadas de anfotericina B liposomal y continuarlo con dosis más bajas era una alternativa terapéutica válida al uso de pautas convencionales de tratamiento con anfotericina B deoxicolato o anfotericina B liposomal. Para ello se emplearon dosis iniciales de anfotericina B liposomal de 10 mg/kg/día que, en humanos, se ha descrito que consiguen valores plasmáticos máximos de C_{max} , ABC_{24} y ABC_{∞} (91). Se han publicado varios trabajos en modelos experimentales de aspergilosis pulmonar invasora en animales neutropénicos (95, 96) e inmunosuprimidos con glucocorticoides en los que se demuestra que esta dosis consigue prolongar la supervivencia, reducir la carga fúngica y el daño pulmonar (95, 96) y evitar la diseminación de la infección (95). La administración de esta dosis se limitó a un máximo de 4 días, ya que en el estudio 1 se observó que un tratamiento más prolongado con 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal causaba en los animales no infectados pero inmunosuprimidos con esteroides una interacción farmacológica que resultaba en un incremento de la tasa de mortalidad.

El análisis de los indicadores de eficacia terapéutica utilizados en este estudio mostró que, en comparación con el grupo control, el tratamiento con 1 mg/kg/día de anfotericina B deoxicolato no producía efectos significativos, mientras que cualquiera de las pautas de tratamiento con anfotericina B liposomal conseguía diferencias significativas en al menos 1 de los 4 parámetros estudiados. Estos resultados se ven apoyados por los de otros modelos experimentales publicados en los que se muestra la

eficacia de dosis de 5 mg/kg/día o superiores en el tratamiento de la aspergilosis invasora (95, 96).

Aunque no se detectaron diferencias evidentes entre las distintas pautas de administración de anfotericina B liposomal, sí se observó una tendencia a la obtención de resultados más favorables cuando se administraron dosis de carga elevadas seguidas de dosis más bajas de anfotericina B liposomal de manera que con 10 mg/kg 4 días seguido de 3 mg/kg/día de la formulación liposomal se consiguieron mejoras significativas en la supervivencia de los animales, peso del bloque pulmonar y contenido de glucosamina en comparación con el grupo que recibió anfotericina B deoxicolato. Estos resultados concuerdan con los de Becker y colaboradores, que también encontraron mejoras en la supervivencia y la carga fúngica pulmonar en un modelo de aspergilosis pulmonar experimental que empleaba ratas neutropénicas y las sometían a un tratamiento con dosis de 10 mg/kg/día de anfotericina B liposomal al que se añadía el primer día la inyección de 1 mg/kg de anfotericina B deoxicolato (104).

A diferencia de lo que ocurría con los otros indicadores de eficacia analizados, el recuento de UFC no varió significativamente entre los diferentes grupos, salvo en el grupo que recibió anfotericina B liposomal 10 mg/kg/4 días seguido de 3 mg/kg/día, que registró un recuento de UFC significativamente inferior al encontrado en el grupo control. Como ya se ha comentado en el estudio 1, es probable que el recuento de UFC no represente de forma fiable la carga fúngica tisular, ya que una mayor cantidad y un mayor tamaño de las hifas suponen una mayor carga fúngica pero no necesariamente dan origen a un mayor número de colonias (96, 104).

Entre la literatura disponible en la actualidad se pueden encontrar diversos trabajos que señalan la importancia de abordar el tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasora de forma agresiva y el enfoque terapéutico basado en el uso de dosis altas iniciales de anfotericina B sigue esta línea (63, 104, 145). Aunque no se encontraron diferencias entre los grupos tratados con anfotericina B liposomal, sí se observó una leve tendencia a la mejora de los resultados con el uso de una dosis de carga prolongada. El posible significado clínico de este hallazgo está por dilucidar y se requiere extrema cautela en su interpretación hasta que se realicen estudios más extensos al respecto. No obstante, los resultados preliminares de un estudio no comparativo realizado en humanos recientemente presentado apuntan en esta misma dirección (146). En este trabajo, Kinsey y colaboradores comunicaron unas tasas de respuesta global, incluyendo respuestas totales y parciales, del 60% en pacientes con infección fúngica invasora probada o probable o con candidiasis diseminada crónica tras administrar un tratamiento inicial de 10 mg/kg/día durante 5 días seguido de 3 mg/kg/día durante 9 días.

El estudio 2 no fue diseñado para determinar la duración exacta del tratamiento de carga con dosis altas, sino que abre el camino a una investigación más exhaustiva sobre el uso de pautas de administración similares en otros modelos de aspergilosis pulmonar invasora experimental.

4.3. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO 3.

Se puede considerar que las concentraciones pulmonares de anfotericina B alcanzadas con las dosis actualmente recomendadas de anfotericina B liposomal, de hasta 5 mg/kg/día, superan las concentraciones mínimas inhibitorias determinadas mediante estudios in vitro para *Aspergillus* spp. In vivo, no obstante, estas concentraciones pueden resultar insuficientes para erradicar el hongo del tejido pulmonar infectado, lo que contribuiría a explicar las bajas tasas de éxito terapéutico que suelen observarse en la aspergilosis invasora (16). Basándose en esta hipótesis se puede plantear una posible estrategia de tratamiento consistente en incrementar la concentración pulmonar de anfotericina B, y esto puede lograrse mediante la administración nebulizada del antifúngico. Se han publicado algunos estudios experimentales con animales según los cuales la administración en aerosol de anfotericina B consigue concentraciones detectables del fármaco en el tejido pulmonar (105, 106, 130), llegando a alcanzar niveles más elevados con las formulaciones lipídicas que con la convencional (106, 147). La nebulización de la anfotericina B hace que el antifúngico quede esencialmente confinado al aparato respiratorio, de lo que derivan las dos ventajas principales de esta forma de administración: la concentración de la práctica totalidad de la actividad del antifúngico en el foco de la infección y la reducción al mínimo del riesgo de efectos indeseables sistémicos (111, 130).

La eficacia de la profilaxis de la infección por *Aspergillus* con anfotericina B nebulizada ha sido ampliamente estudiada. Se han publicado diversos estudios experimentales en modelos de aspergilosis pulmonar invasora que demuestran que la administración profiláctica de anfotericina B en aerosol mejora la

supervivencia de los animales tratados en comparación con la de los controles no tratados (106, 111, 147) y, en humanos, también se ha descrito que la profilaxis con anfotericina B nebulizada protege frente a la infección por *Aspergillus* spp. en los receptores de trasplante pulmonar (109, 148). Por el contrario, existen muy pocos estudios centrados en la investigación de la eficacia de la nebulización de anfotericina B como tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasora (110, 111). Ruijgrok y colaboradores demostraron que la nebulización de anfotericina B liposomal era útil en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar experimental desarrollada en un modelo de infección en ratas neutropénicas. En su trabajo se muestra que la supervivencia de los animales tratados con anfotericina B liposomal nebulizada fue significativamente mayor que la de los animales que no recibieron tratamiento antifúngico (110). En lo que respecta a humanos, Ruffini y colaboradores describieron que la administración de anfotericina B liposomal nebulizada sola consiguió resolver 9 episodios de colonización por *Aspergillus* y, asociada a anfotericina B liposomal por vía intravenosa, consiguió una respuesta favorable en 4 de 4 casos de aspergilosis invasora (112).

En el estudio 3 la administración en aerosol de anfotericina B se mostró como una herramienta eficaz para el tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasora experimental. El tratamiento con anfotericina B nebulizada, tanto deoxicolato como liposomal, consiguió prolongar la supervivencia de los animales tratados en comparación con la del grupo control. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Ruijgrok y colaboradores (110) y Schmitt y colaboradores (111), que estudiaron la eficacia del tratamiento con anfotericina B liposomal y anfotericina B deoxicolato nebulizadas respectivamente en diferentes modelos

experimentales de aspergilosis pulmonar invasora. También están en la línea de los datos comunicados por Gilbert y colaboradores, quienes en un modelo murino de criptococosis pulmonar mostraron que los animales tratados con anfotericina B liposomal nebulizada presentaban un recuento de UFC significativamente más bajo que los animales del grupo control que no recibieron tratamiento (149).

Los resultados de este estudio mostraron que el tratamiento basado en la nebulización de anfotericina B, tanto deoxicolato como liposomal, mejoró la supervivencia y el peso del bloque pulmonar con respecto al grupo control o al que recibió anfotericina B deoxicolato por vía i.v. La nebulización de anfotericina B liposomal, no obstante, no sólo consiguió valores en estos parámetros de eficacia ligeramente más favorables que anfotericina B deoxicolato en aerosol sino que también fue la única pauta terapéutica que redujo significativamente el contenido pulmonar de glucosamina en comparación con el control o el grupo tratado con anfotericina B deoxicolato i.v.. A pesar de la falta de diferencias significativas en los recuentos de UFC entre los diferentes grupos, los resultados, de nuevo, tendieron a ser más bajos en los grupos que recibieron anfotericina B liposomal nebulizada.

En conjunto, los resultados de este estudio parecen indicar que tanto anfotericina B deoxicolato como anfotericina B liposomal alcanzan concentraciones adecuadas en el órgano diana de la infección, es decir, en el pulmón cuando se administran en aerosol, aunque es posible que la concentración conseguida con anfotericina B liposomal sea algo superior a la obtenida con anfotericina B deoxicolato.

La combinación de anfotericina B liposomal nebulizada y por vía intravenosa no mejoró los resultados obtenidos con la administración de anfotericina B liposomal nebulizada sola, debido a que es probable que ambas pautas consigan concentraciones pulmonares de anfotericina similares. Aunque no se investigó si la combinación era eficaz en la prevención de la diseminación extrapulmonar, esta estrategia de tratamiento parece prudente ya que, en humanos, es difícil descartar una diseminación a distancia de la infección en el momento en que se efectúa el diagnóstico de infección pulmonar por *Aspergillus*.

5. CONCLUSIONES

- El modelo experimental de aspergilosis invasora pulmonar en ratas inmunosuprimidas con glucocorticoides es útil en los estudios de eficacia terapéutica de fármacos antifúngicos.
- Existe una relación entre la dosis administrada de anfotericina B liposomal y su eficacia terapéutica.
- El uso de dosis altas de carga al inicio del tratamiento es una alternativa válida al tratamiento convencional con 1 mg/kg/día de d-AmB en el modelo experimental de aspergilosis pulmonar invasora en ratas inmunosuprimidas con glucocorticoides. Los datos obtenidos en este estudio no permiten inferir la duración del tratamiento inicial con dosis elevadas, siendo necesarios estudios más amplios al respecto.
- La administración de anfotericina B nebulizada, en particular de la formulación liposomal, puede ser útil en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar experimental.
- El tratamiento combinado con anfotericina B liposomal por vía inhalatoria e intravenosa parece una aproximación prudente al tratamiento de la aspergilosis invasora pulmonar por la dificultad existente para descartar la diseminación extrapulmonar en humanos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Clark TA, Hajjeh RA.** Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis.* 2002; 15:569-74
2. **Denning DW.** Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 1998; 26:781-805
3. **Connolly JE Jr, McAdams HP, Erasmus JJ, Rosado-de-Christenson ML.** Opportunistic fungal pneumonia. *J Thorac Imaging.* 1999; 14:51-62
4. **Denning DW.** Aspergillosis in "nonimmunocompromised" critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170:580-1
5. **Maschmeyer G, Ruhnke M.** Update on antifungal treatment of invasive *Candida* and *Aspergillus* infections. *Mycoses.* 2004; 47:263-76
6. **Ohmagari N, Raad II, Hachem R, Kontoyiannis DP.** Invasive aspergillosis in patients with solid tumors. *Cancer.* 2004; 101:2300-2
7. **Boucher HW, Groll AH, Chiou CC, Walsh TJ.** Newer systemic antifungal agents: pharmacokinetics, safety and efficacy. *Drugs.* 2004; 64:1997-2020
8. **Patterson TF.** *Aspergillus* species. En: "Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases". Vol 2. 6^a Ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Eds. Churchill Livingstone. Filadelfia. 2004; pag 2958-73.
9. **Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA; Mycoses Study Group.** The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1824-33
10. **Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.** Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and

- hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis. 2002; 34:7-14
11. **Ruiz I, Rovira M, Gavaldà J, Molina I, Jarque I, Cámara R, Martino R, Parody R, de la Torre J, Borrell N, Aguado JM, Fortún J, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Pahissa A.** Proven or Probable Invasive Fungal Infections (IFI) in Hematopoietic Stem Cell (HSCT) Transplant Recipients. Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. 2006
 12. **Gavaldà J, Len O, Rovira M, Borrell N, Cámara R, Cisneros J, Fortún J, Lumbreras C, Montejo M, Muñoz P, Peña F, Ramos A, de la Torre J, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela J, Pahissa A.** Epidemiology of invasive fungal infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective study from RESITRA. Abstr 45th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. abstr 990, 2005.
 13. **Abbasi S, Shenep JL, Hughes WT, Flynn PM.** Aspergillosis in children with cancer: a 34-year experience. Clin Infect Dis. 1999; 29: 1210-9
 14. **Wallace JM, Lim R, Browdy BL, Browdy BL, Hopewell PC, Glassroth J, Rosen MJ, Reichman LB, Kvale PA.** Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* in respiratory specimens from persons with HIV disease. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. Chest. 1998; 114: 131-7
 15. **Wald A, Leisenring W, van Burik J, Bowden RA.** Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. J Infect Dis 1997; 175:1459-66
 16. **Lin SJ, Shranz J, Teutsch SM.** Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis. 2001; 32:358-366
 17. **Iriya SM, Capelozzi VL, Calich I, Martins MA, Lichtenstein A.** Causes of death in patients with systemic lupus erythematosus in São Paulo, Brazil: a study of 113 autopsies. Arch Intern Med. 2001; 161:1557
 18. **Guarro J, Gené J, Stchigel AM.** Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999; 12:454-500

19. **Mullins J, Harvey R, Seaton A.** Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres.). Clin Allergy. 1976; 6:209-17
20. **Latgé JP.** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12:310-50
21. **Tronchin G, Bouchara JP, Larcher G, Lissitzky JC, Chabasse D.** Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. Biol Cell. 1993; 77:201-8
22. **Bouchara JP, Larcher G, Joubard F, Penn P, Tronchin G, Chabasse D.** Extracellular fibrinogenolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus* substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993; 77:81-92
23. **Hogan LH, Klein BS, Levitz SM.** Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev. 1996; 9:469-88
24. **Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Ponton J, Garaizar J.** Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. Rev Iberoam Micol. 2005; 22:1-23
25. **Reichard U, Lechenne B, Asif AR, Streit F, Grouzmann E, Jousson O, Monod M.** Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. Appl Environ Microbiol. 2006; 72:1739-48
26. **Schaffner A, Douglas H, Braude A.** Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*: observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. J Clin Invest. 1982; 69:617-31
27. **Clemons KV, Calich VL, Burger E, Filler SG, Graziutti M, Murphy J, Roilides E, Campa A, Dias MR, Edwards JE Jr, Fu Y, Fernandes-Bordignon G, Ibrahim A, Katsifa H, Lampaignere CG, Meloni-Bruneri LH, Rex J, Savary CA, Xidieh C.** Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. Med Mycol. 2000; 38 Suppl 1:99-111
28. **Diamond RD; Krzesicki R, Epstein B, Jao W.** Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes in vitro: a possible host defense

- mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *Am J Pathol.* 1978; 91:313-28
29. **Berenguer J, Allende MC, Lee J, Garret K, Lyman C, Ali NM, Bacher J, Pizzo PA, Walsh TJ.** Pathogenesis of pulmonary aspergillosis – granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone induced immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152:1079-86
30. **Diamond RD.** Inhibition of monocyte-mediated damage to fungal hyphae by steroid hormones. *J Infect Dis* 1983; 147:160
31. **Palmer LB, Greenberg ME, Schiff MS.** Corticosteroid treatment as a risk factor for invasive aspergillosis in patients with lung disease. *Thorax.* 1991; 46:15-20
32. **Roilides E, Unlig K, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ.** Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphonuclear leukocyte-induced damage of *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect Immun.* 1993; 61:4870-7
33. **Roilides E, Blake C, Holmes A, Pizzo PA, Walsh TJ.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon- γ prevent dexametasone induced immunosuppression of antifungal monocyte activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34:63-9
34. **Lionakis MS, Kontoyiannis DP.** Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* 2003; 362:1828-38
35. **Meier-Osuski I, Schoedon G, Blauer F, Scheemann M, Schaffner A.** Comparison of the antimicrobial activity of deactivated human macrophages challenged with *Aspergillus fumigatus* and *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis.* 1996; 174:651-4
36. **Schaffner A.** Macrophage-*Aspergillus* interactions. *Immunology.* 1994; 60:545-52
37. **Merkow L, Pardo M, Epstein SM, Verney E, Sidransky H.** Lysosomal stability during phagocytosis of *Aspergillus flavus* spores by alveolar macrophages of cortisone-treated mice. *Science.* 1968; 160:79-8

38. **Merkow LP, Epstein SM, Sidransky H, Verney E, Pardo M.** The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis. A ultrastructural study of alveolar macrophages after phagocytosis of *A. flavus* spores in vivo. *Am J Pathol.* 1971; 62:57-68
39. **Ng TT, Robson GD, Denning DW.** Hydrocortisone-enhanced growth of *Aspergillus* spp: implications for pathogenesis. *Microbiology.* 1994; 140:2475-9
40. **O'Donnell MR, Schmidt GM, Tegtmeier BR, Faucett C, Fahey JL, Ito J, Nademanee A, Niland J, Parker P, Smith EP.** Prediction of systemic fungal infection in allogenic marrow recipients: impact of amphotericin prophylaxis in high-risk patients. *J Clin Oncol.* 1994; 12:827-34
41. **Ribaud P, Chastang C, Latge JP, Baffroy-Lafitte L, Parquet N, Devergie A, Esperou H, Selimi F, Rocha V, Esperou H, Selimi F, Rocha V, Derouin F, Socie G, Gluckman E.** Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.* 1999; 28:322-30
42. **Gavaldà J, Mellado E.** Aspergilosis. En "Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica". V. Ausina V y S. Moreno Eds. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2006; pp 637-46
43. **Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, Rinaldi MG, Stevens DA, Graybill JR for the I3 Aspergillus Study Group.** Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Medicine* 2000; 79:250-60
44. **Cohen J.** Clinical manifestations and management of aspergillosis in the compromised patients. En "Fungal infection in the compromised patient". Warnock DW, Richardson MD Eds. John Wiley & Sons Ltd. New York. 1991; pag:117-52
45. **Herbert PA, Bayer AS.** Fungal pneumonia (part 4). Invasive pulmonary aspergillosis. *Chest.* 1981; 80:220-5
46. **Weiland D, Ferguson RM, Peterson PK, Snover DC, Simmons RL, Najarian JS.** Aspergillosis in 25 renal transplant patients. *Epidemiology,*

- clinical presentation, diagnosis and management. *Ann Surg.* 1983; 198: 622-9
47. **McWhinney PHM, Kibbler CC, Hamon MD, Smith OP, Gandi L, Berger LA, Walesby RK, Hoffbrand AV, Prentice HG.** Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years' experience. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 397-404
48. **Miller WT Jr, Sais GJ, Frank I, Geftter WB, Aronchick JM, Miller WT.** Pulmonary aspergillosis in patients with AIDS. Clinical and radiographic correlations. *Chest.* 1994; 105:37-44
49. **Abelda SM, Talbot H, Gerson SL, Miller WT.** Pulmonary cavitation and massive hemoptysis in invasive pulmonary aspergillosis. Influence of bone marrow recovery in patients with acute leukemia. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 131:115-20
50. **Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, Solary E, Piard F, Petrella T, Bonnin A, Couillault G, Dumas M, Guy H.** Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol.* 1997; 15:139-47
51. **Mori M, Galvin JR, Barloon TJ, Gingrich RD, and Stanford W.** Fungal pulmonary infections after bone marrow transplantation: evaluation with radiography and CT. *Radiology.* 1991; 178: 721-6
52. **Staples CA, Kang EY, Wright JL, Phillips P, Müller NL.** Invasive pulmonary aspergillosis in AIDS: radiographic, CT, and pathologic findings. *Radiology.* 1995; 196:409-14
53. **Kuhlman JE, Fishman EK, Siegelman SS.** Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. *Radiology.* 1985; 157:611-4
54. **Primack SL, Hartman TE, Lee KS, Müller NL.** Pulmonary nodules and the CT halo sign. *Radiology.* 1994; 190:513-5
55. **Brodoefel H, Vogel M, Hebart H, Einsele H, Vonthein R, Claussen C, Horger M.** Long-term CT follow-up in 40 non-HIV immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis: kinetics of CT morphology

- and correlation with clinical findings and outcome. *Am J Roentgenol.* 2006; 187:404-13.
56. **Lortholary O, Mehoyas MC, Dupont B, Cadranel J, Salmon-Ceron D, Peyramond D, Simonin D.** Invasive aspergillosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: report of 33 cases. *Am J Med.* 1993; 95:177-87
 57. **Mouy R, Fischer A, Vilmer E, Seger R, Griscelli C.** Incidence, severity and prevention of infections in chronic granulomatous disease. *J Pediatr.* 1989; 114:555-60
 58. **Denning DW, Stevens DA.** Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2121 published cases. *Rev Infect Dis.* 1990. 12:1147-201
 59. **Lumbreras C, Gavalda J.** Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Rev Iberoam Micol.* 2003; 20:79-89
 60. **Flückiger U, Marchetti O, Bille J, Eggimann P, Zimmerli S, Imhoff A, Garbino J, Ruef C, Pittet D, Glauser M, Calandra T for the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS).** Treatment options of invasive fungal infections in adults. *Swiss Med Wkly.* 2006; 136:447-63.
 61. **Böme A, Ruhnke M, Buchheidt D, Karthaus M, Einsele H, Guth S, Heussel G, Heussel Cp, Junghanss C, Kern WK, Kubin T, Mashmeyer G, Sezer O, Silling G, Südhoff T, Szelényi, Ullmann AJ.** Treatment of fungal infections in hematology and oncology. Guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol.* 2003; 82 (Suppl 2):s133-40
 62. **Gavalda J, Ruiz I por parte de los Grupos de Estudio de Micología Médica (MICOMED) y de Infección en el Transplante (GESITRA) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.** Recomendaciones para el tratamiento de la infección por *Aspergillus* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21:571
 63. **Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, Bennet JE, Walsh TJ, Patterson TF, Pankey GA.** Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:696-709

64. **Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, Hiemenz J, Schwartz C, Bodensteiner D, Pappas P, Seibel N, Greenberg RN, Dummer S, Schuster M, Holcenberg JS.** Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *N Engl J Med.* 1999; 340:764-71
65. **Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J, Yanovich S, Stiff P, Greenberg R, Donowitz G, Schuster M, Reboli A, Wingard J, Arndt C, Reinhardt J, Hadley S, Finberg R, Laverdiere M, Perfect J, Garber G, Fioritoni G, Anaissie E, Lee J; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group.** Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med.* 2002; 346:225-34
66. **Walsh TJ, Tepler H, Donowitz GR, Maertens JA, Baden LR, Dmoszynska A, Cornely OA, Bourque MR, Lupinacci RJ, Sable CA, dePauw BE.** Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Engl J Med.* 2004; 351:1391-402
67. **Donovick R, Gold W, Pagano JF, Stout HA.** Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot Annu.* 1955-1956; 3:579-86
68. **Andriole VT.** Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 44:151-62
69. **Lortholary O, Charlemagne A, Bastides F, Chevalier P, Datry A, Gonzalves MF, Michel G, Tilleul P, Veber B, Herbrecht R.** A multicentre pharmacoepidemiological study of therapeutic practices in invasive fungal infections in France during 1998-1999. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:456-64
70. **Baginski M, Resat H, McCammon JA.** Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Molec Pharmacol.* 1997; 52:560-70

71. **Gavaldà J, Len O, San Juan R, Aguado JM, Fortún J, Lumbreras C, Moreno A, Muñoz P, Blanes M, Ramos A, Rufi G, Gurgui M, Torre-Cisneros J, Montejo M, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, and Pahissa A, for RESITRA (Spanish Network for Research on Infection in Transplantation).** Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 52-9
72. **Ostroski-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH.** Amphotericin B: time for a new “gold standard”. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:415-25
73. **Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B; Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study Group.** Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002; 347:408-15
74. **Bowden R, Chandrasekar P, White MH, Li X, Pietrelli L, Gurwith M, van Burik JA, Laverdiere M, Safrin S, Wingard JR.** A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2002; 35:359-66
75. **Walsh TJ, Lyman CA.** New antifungal compounds and strategies for treatment of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. *Cancer Treat Res.* 1995; 79:113-48
76. **Daneshmend TK, Warnock DW.** Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1983; 8:17-42
77. **Matot I, Pizov R.** Pulmonary extraction and accumulation of lipid formulations of amphotericin B. *Crit Care Med.* 2000; 28:2528-32
78. **Patel R.** Antifungal agents. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clin Proc.* 1998; 73:1205-25

79. **Gavalda J, Ruiz I; Grupo de Estudio de Micología Medica (MICOMED); Grupo de Estudio de Infección en el Transplante (GESITRA); Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).** Recomendaciones para el tratamiento de la infección por *Aspergillus* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21:571-8
80. **Janknegt R, de Marie S, Bakker-Woudenberg IA, Cromelin DJ.** Liposomal and lipid formulations of amphotericin B: clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokin.* 1992; 23:279-91
81. **Hartsel S, Bolard J.** Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends Pharmacol Sci.* 1996; 17:445-9
82. **Dismukes WE.** Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:653-57
83. **Adler-Moore J, Proffitt RT.** AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49 (Suppl 1):21-30
84. **Heinemann V, Kahny B, Debus A, Wachholz K, Jehn U.** Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (AmBisome versus other lipid-based formulations. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14 (suppl 5):8-9
85. **Heinemann V, Bosse D, Jehn U, Kahny B, Wachholz K, Debus A, Scholz P, Kolb HJ, Wilmanns W.** Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (AmBisome) in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:1275-80
86. **Ng TT, Denning DW.** Liposomal amphotericin B (AmBisome) therapy in invasive fungal infections: evaluation of United Kingdom compassionate use data. *Arch Intern Med.* 1995; 155:1093-98
87. **Meunier F, Prentice HG, Ringden O.** Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 28 (suppl. B):83-91
88. **Olson JA, Adler-Moore JP, Schwartz J, Jensen GM, Proffitt RT.** Comparative efficacies, toxicities, and tissue concentrations of

- amphotericin B lipid formulations in a murine pulmonary aspergillosis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:2122-31
89. **Heinemann V, Bosse D, Jehn U, Debus A, Wachholz K, Forst H, Wilmanns W.** Enhanced pulmonary accumulation of liposomal amphotericin B (AmBisome) in acute live transplant failure. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40:295-7
 90. **Proffitt RT, Satorius A, Chiang SM, Sullivan L, Adler-Moore JP.** Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 28 Suppl B: 49-61. Erratum en: *J Antimicrob Chemother* 1992; 29:355
 91. **Walsh TJ, Goodman JL, Pappas P, Bekersky I, Buell DN, Roden M, Barrett J, Anaissie EJ.** Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:3487-96
 92. **Wingard JR, White MH, Anaissie E, Raffalli J, Goodman J, Arrieta A; L Amph/ABLC Collaborative Study Group.** A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. *L Amph/ABLC Collaborative Study Group. Clin Infect Dis.* 2000; 31:1155-63
 93. **Walsh TJ, Yeldandi V, McEvoy M, Gonzalez C, Chanock S, Freifeld A, Seibel NI, Whitcomb PO, Jarosinski P, Boswell G, Bekersky I, Alak A, Buell D, Barret J, Wilson W.** Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:2391-8
 94. **Bekersky I, Boswell GW, Hiles R, Fielding RM, Buell D, Walsh TJ.** Safety, toxicokinetics and tissue distribution of long-term intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome): a 91-day study in rats. *Pharm Res.* 2000; 17:1494-502
 95. **Leenders AC, de Marie S, ten Kate MT, Bakker-Woudenberg IA, Verbrugh HA.** Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate

- (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 38:215-25
96. **Francis P, Lee JW, Hoffman A, Peter J, Francesconi A, Bacher J, Shelhamer J, Pizzo PA, Walsh TJ.** Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalveolar D-mannitol and serum galactomannan as markers of infection. *J Infect Dis.* 1994; 169:356-68
97. **Boswell GW, Buell D, Bekersky I.** AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review. *J Clin Pharmacol.* 1998; 38:583-92. Erratum en: *J Clin Pharmacol* 1999; 39:428
98. **Adler-Moore J, Proffitt RT.** Effect of tissue penetration on AmBisome efficacy. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003; 4:179-85
99. **Graybill JR, Bocanegra R.** Liposomal amphotericin B therapy of murine histoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:1885-87
100. **Clemons KV, Sobel RA, Williams PL, Pappagianis D, Stevens DA.** Efficacy of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) against coccidioidal meningitis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:2420-6
101. **Adler-Moore JP, Olson JA, Proffitt RT.** Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (AmBisome) effective in treating murine systemic candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:1096-102
102. **Garcia A, Adler-Moore JP, Proffitt RT.** Single-dose AmBisome (Liposomal amphotericin B) as prophylaxis for murine systemic candidiasis and histoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:2327-32
103. **Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJ, Farinotti R, Derouin F.** Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40:1214-8

104. **Becker MJ, de Marie S, Fens MH, Hop WC, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA.** Enhanced antifungal efficacy in experimental invasive pulmonary aspergillosis by combination of AmBisome with Fungizone as assessed by several parameters of antifungal response. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:813-20
105. **Niki Y, Bernard EM, Schmitt HJ, Tong WP, Edwards FF, Armstrong D.** Pharmacokinetics of aerosol amphotericin B in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34:29-32
106. **Allen SD, Sorensen KN, Nejd M, Durrant C, Proffit RT.** Prophylactic efficacy of aerosolized liposomal (AmBisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 34:1001-13
107. **Beyer J, Barzen G, Risse G, Weyer C, Miksits K, Dullenkopf K, Huhn D, Siegert W.** Aerosol amphotericin B for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37:1367-9
108. **Calvo V, Borro JM, Morales P, Morcillo A, Vicente R, Tarrazona V, Paris F.** Antifungal prophylaxis during the early postoperative period of lung transplantation. Valencia Lung Transplant Group. *Chest.* 1999; 115:1301-4
109. **Monforte V, Roman A, Gavalda J, Bravo C, Tenorio L, Ferrer A, Maestre J, Morell F.** Nebulized amphotericin B prophylaxis for *Aspergillus* infection in lung transplantation: study of risk factors. *J Heart Lung Transplant.* 2001; 20:1274-81
110. **Ruijgrok EJ, Vulto AG, Van Etten EWM.** Efficacy of aerosolized amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in severely immunocompromised rats. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 48:89-95
111. **Schmitt HJ, Bernard EM, Häuser M, Armstrong D.** 1988. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32:1676-9

112. **Ruffini E, Baldi S, Libertucci D, Solidoro P, di Marcio P, Cavallo A, Mancuso M.** Aerosolized liposomal amphotericin B: a novel and effective treatment for *Aspergillus* infections in lung transplant recipients. Abstr. 42th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1237, 2002
113. **Zak O, Sande ME.** Introduction: the role of animal model in the evaluation of new antibiotics. En "Experimental models in antimicrobial chemotherapy". O Zak y MA Sande Eds. Academic Press. London. 1986; pag 1-5
114. **O'Reilly T, Cleeland R, Squires EL.** Evaluation of antimicrobials in experimental animal Infections. En "Antibiotics in laboratory medicine". Lorian V Ed.-4^aEd. Williams & Wilkins. Baltimore. 1996; pag 604-765
115. **Schmidt A.** Animal models of aspergillosis - also useful for vaccination strategies?. *Mycoses*. 2002; 45:38-40
116. **Polak A.** Experimental models in antifungal chemotherapy. *Mycoses*. 1998; 41:1-30
117. **Lionakis MS, Lewis RE, May GS, Wiederhold NP, Albert ND, Halder G, Kontoyiannis DP.** Toll-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J Infect Dis*. 2005; 191:1188-95
118. **Kumar V, Singh GP, Babu AM.** Surface ultrastructural studies on the germination, penetration and conidial development of *Aspergillus flavus* Link:Fries infecting silkworm, *Bombyx mori* Linn. *Mycopathologia*. 2004; 157:127-35
119. **Corbel MJ, Eades SM.** Examination of the effect of age and acquired immunity on the susceptibility of mice to infection with *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia*. 1977; 60:79-85
120. **Dixon DM, Polak A, Walsh TJ.** Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect Immun*. 1989; 57:1452-6

121. **Niki Y, Bernard EM, Edwards FF, Schmitt HJ, Yu B, Armstrong D.** Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1317-23
122. **Prosser JI.** Kinetics of filamentous growth and branching. En "The growing fungus". Gow NAR y Gadd GM Eds. Chapman & Hall. Londres. 1994; pag 301-18
123. **Balloy V, Huerre M, Latgé JP, Chignard M.** Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 2005; 73:494-503
124. **Duong M, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Olivier M, Bergeron MG.** Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J Infect Dis.* 1998; 178:1472-82
125. **Dodds ES, Drew RH, Perfect JR.** Antifungal pharmacodynamics: review of the literature and clinical applications. *Pharmacotherapy.* 2000; 20:1335-55
126. **Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Guarro J.** Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:2273-5
127. **Clemons KV, Stevens DA.** Comparative efficacies of four amphotericin B formulations--Fungizone, amphotec (Amphocil), AmBisome, and Abelcet--against systemic murine aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:1047-50
128. **Ellis ME, al-Hokail AA, Clink HM, Padmos MA, Ernst P, Spence DG, Tharpe WN, Hillier VF.** Double-blind randomized study of the effect of infusion rates on toxicity of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36:172-9
129. **Oldfield EC 3rd, Garst PD, Hostettler C, White M, Samuelson D.** Randomized, double-blind trial of 1- versus 4-hour amphotericin B infusion durations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34:1402-6

130. **Ruijgrok EJ, Vulto AG, Van Etten EW.** Aerosol delivery of amphotericin B desoxycholate (Fungizone) and liposomal amphotericin B (AmBisome): aerosol characteristics and in-vivo amphotericin B deposition in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2000; 52:619-27.
131. **Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Gavaldà J.** Modelos animales de infecciones fúngicas. En "Modelos experimentales de patología infecciosa". Miró JM y Gatell JM Eds. Fundación Dr. Antonio Esteve. Barcelona. 2000; pag 119-34
132. **Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Piscitelli S, Candelario M, Field-Ridley A, Avila N, Bacher J, Walsh TJ.** Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:857-69
133. **Becker MJ, de Marie S, Willemse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA.** Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1434-8
134. **Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najvar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Dietz K, Bialek R, Einsele H.** Polymerase chain reaction detection of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *J Infect Dis.* 2002; 185:1203-6
135. **Bowman JC, Abruzzo GK, Anderson JW, Flattery AM, Gill CJ, Pikounis VB, Schmatz DM, Liberator PA, Douglas CM.** Quantitative PCR assay to measure *Aspergillus fumigatus* burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:3474-81
136. **Frimodt-Møller N, Knudsen JD, Espersen F.** The mouse peritonitis/sepsis model. En "Handbook of animal models of infection". O. Zak y MA Sande Eds. Academic Press. San Diego. 1999; pag 127-36
137. **Azoulay-Dupuis E, Moine P.** Mouse pneumococcal pneumonia models. En "Handbook of animal models of infection". O. Zak y MA Sande Eds. Academic Press. San Diego. 1999; pag 481-93

138. **Lefort A, Fantin B.** Rabbit model of bacterial endocarditis. En "Handbook of animal models of infection". O. Zak y MA Sande Eds. Academic Press. San Diego. 1999; pag:611-7
139. **Lehmann PF, White LO.** Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. Infect Immun. 1975; 12:987-92
140. **Gooday GW.** Cell walls. En "The growing fungus". Gow NAR y Gadd GM. Eds. Chapman & Hall. Londres. 1994; pag 43-62
141. **Ride JP, Drysdale RB.** A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiol Plant Pathol. 1972; 2:7-15
142. **Gavaldà J, López P, Martín T, Gomis X, Rosal M, Almirante B, Pigrau C, Pahissa A.** Comparative efficacy of lipid formulations of amphotericin B in the treatment of experimental aspergillosis. Abstr 40th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. abstr 1682, 2000
143. **Becker MJ, de Marie S, Fens MH, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA.** Effect of amphotericin B treatment on kinetics of cytokines and parameters of fungal load in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. J Antimicrob Chemother. 2003; 52:428-34
144. **Kisch AL, Maydew RP, Evan AP.** Synergistic nephrotoxicity of amphotericin B and cortisone acetate in mice. J Infect Dis. 1978; 137:789-94
145. **Mehrad B, Paciocco G, Martinez FJ, Ojo TC, Iannettoni MD, Lynch JP 3rd.** Spectrum of *Aspergillus* infection in lung transplant recipients: case series and review of the literature. Chest. 2001; 119:169-75
146. **Kinsey S, Holyoake T, McCann S, Gibson B, Jones B, Waters F, Taylor P on behalf of the UK and Ireland High Dose Study Group.** Results of an open-label study of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of confirmed fungal infections in high risk patients [abstract 202]. In: Abstracts of the papers presented at the Annual Scientific Meeting of the British Society for Haematology, Cardiff, UK: Br J Haematol 2004; 125 (suppl 1): 62

147. **Cicogna CE, White MH, Bernard EM, Ishimura T, Sun M, Tong WP, Armstrong D.** Efficacy of prophylactic aerosol amphotericin B lipid complex in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:259-61
148. **Minari A, Husni R, Avery RK, Longworth DL, DeCamp M, Bertin M, Schilz R, Smedira N, Haug MT, Mehta A, Gordon SM.** The incidence of invasive aspergillosis among solid organ transplant recipients and implications for prophylaxis in lung transplants. *Transpl Infect Dis.* 2002; 4:195-200
149. **Gilbert BE, Wyde PR, Wilson SZ.** Aerosolized liposomal amphotericin B for treatment of pulmonary and systemic *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36:1466-71

