

Studio clinico e di istopatologia renale in seguito a somministrazione di miltefosina e antimonio di N-metilglucamina in cani Beagle sani

RIASSUNTO

In corso di Leishmaniosi canina (LCan) i reni sono potenzialmente colpiti in tutti i cani. Il trattamento della LCan in Europa è attualmente limitato a due principi attivi registrati per questa indicazione nel cane: l'antimonio di N-metilglucamina e la miltefosina. Questo studio ha valutato gli effetti clinici, tossicologici e patologici, di entrambi i farmaci in otto cani controllo di razza Beagle, suddivisi in due gruppi. Agli animali del gruppo 1 è stata somministrata una soluzione orale al 2% di miltefosina, alla dose di 2 mg/kg di peso corporeo una volta al giorno, per 28 giorni. Agli animali del gruppo 2 è stata somministrata una preparazione a base di antimonio di N-metilglucamina alla dose di 100 mg/kg di peso corporeo per via sottocutanea una volta al giorno per 28 giorni. Dopo il trattamento, tutti i cani sono stati controllati, per un ulteriore periodo di 28 giorni. I cani sono stati osservati quotidianamente e sottoposti ad un esame clinico completo 10 volte nel corso dello studio. Al giorno -1 e 55 è stata effettuata una biopsia renale eco-guidata su tutti i cani. I campioni biotici sono stati analizzati con microscopia ottica, immunofluorescenza e microscopia elettronica. Gli esami clinici, emato-biochimici ed istopatologici nei cani trattati con miltefosina sono risultati nella norma. Viceversa, tutti i cani trattati con antimonio di N-metilglucamina hanno mostrato all'esame istopatologico un diffuso danno tubulare. In conclusione, anche se in assenza di segni clinici evidenti, l'uso di antimonio di N-metilglucamina nell'approccio terapeutico di cani affetti da LCan, potrebbe risultare fonte di ulteriore aggravamento delle lesioni già presenti. Questa ipotesi, tuttavia, necessita di ulteriori approfondimenti e conferme.

Paolo Bianciardi,¹ Claudia Vischer,² Claudio Brovida,³ Marialuisa Valente,⁴ Luca Aresu,⁵ Laura Cavicchioli,⁵ Massimo Castagnaro⁵

¹ Via dell'Usignolo 1, 20147 Milano, Italia

² Virbac S.A., Carros, Francia

³ ANUBI® Ospedale per Animali da Compagnia, Strada Genova, 299/A, 10024 Moncalieri, Torino, Italia

⁴ Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, Università di Padova, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Via A. Gabelli 61, 35121 Padova, Italia

⁵ Dipartimento di Sanità Pubblica Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 Agripolis, 35020 Legnaro, Padova, Italia

INTRODUZIONE

La Leishmaniosi canina (LCan) è una malattia multi-sistemica con segni clinici estremamente polimorfi^{1,2,3}. La maggior parte dei cani colpiti presenta perdita di peso, atrofia muscolare generalizzata, linfadenomegalia e forme dermatologiche generalmente di tipo furfuraceo. I reni sono colpiti in tutti i cani con LCan, e la malattia renale può essere la sola alterazione patologica riscontrabile^{4,5}. Fino a poco tempo fa, il farmaco più comunemente usato per il trattamento della LCan è stato l'antimonio di N-metilglucamina (Glucantime®), da solo o in combinazione con l'allopurinolo^{6,7}. Nel 2007 è stata registrata in alcuni paesi dell'Unione Europea la prima terapia orale per la LCan a base di miltefosina. La miltefosina (1-O-hexadecylphosphocholina, Milteforan®), è un'alchilfosfocolina, analogo sintetico dei fosfolipidi della membrana cellulare dei protozoi. Originariamente sviluppata per il trattamento delle metastasi cutanee del carcinoma mammario⁸, la miltefosina ha dimostrato di essere un efficace trattamento nei confronti sia delle Leishmaniosi umane^{9,10,11,12,13} sia, più recentemente, della Leishmaniosi canina^{14,15}. Sebbene il trattamento della LCan sia attualmente limitato in alcuni paesi Europei principalmente all'antimonio di N-metilglucamina ed alla miltefosina, le informazioni riguardanti l'impatto clinico patologico di questi farmaci sui reni dei cani sottoposti a trattamento, sono estremamente limitate. Dal momento che una specifica valutazione degli effetti di questi farmaci sui reni di cani colpiti da LCan è quasi impossibile a causa della sovrapposizione di danni dovuti alla malattia stessa e quelli eventualmente dovuti alla terapia, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'impatto clinico, tossicologico e patologico di un trattamento standard con entrambi i farmaci in cani sani di razza Beagle. Con questo obiettivo è stato eseguito un esame delle biopsie renali, comprendente esame istologico in microscopia ottica, immunofluorescenza e microscopia elettronica a trasmissione.

MATERIALI E METODI

Animali. Nello studio sono stati inclusi otto cani sani di razza Beagle, provenienti da un allevamento specializzato di Harlan (Paesi Bassi). Gli animali avevano un'età variabile tra i 7 ed i 9 mesi e pesavano da 7 a 9 kg all'inizio dello studio. Tutti i soggetti sono stati ospitati in box individuali in un ambiente controllato con un ciclo di luce di 12 ore, una temperatura di 18 ± 3 °C e umidità relativa pari al $55 \pm 10\%$. I cani sono stati alimentati con alimenti secchi per animali da compagnia (Virbac Vet Complex®) in dosi indicate in etichetta in base al loro peso. L'acqua era disponibile *ad libitum*. Tutte le procedure ed il mantenimen-

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 08/05/2009 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 01/08/2009".

TABELLA 1
Identificazione dei cani per gruppo di trattamento

Gruppo di trattamento	
<u>Gruppo n° 1:</u> Miltefosina (Milteforan®, Virbac: 2 mg/kg per OS, SID per 28 giorni)	<u>Gruppo n°2:</u> Antimoniato di N-metilglucamina (Glucantime®, Merial: 100 mg/kg SC, SID per 28 giorni)
H7E 1023 Femmina	H7I 1417 Femmina
H7I 1401 Femmina	H7G 1329 Femmina
H7F 1144 Maschio	H7F 1076 Maschio
H7G 1342 Maschio	H7E 0886 Maschio

to degli animali sono stati eseguiti in conformità con le regole riguardanti il benessere animale elaborate dal Ministère de la Santé Francese. Tutti i cani sono stati identificati con un codice tatuato sulla superficie interna dell'orecchio.

Articolazione dello Studio. I cani sono stati divisi in due gruppi randomizzati (Tabella 1). Agli animali del gruppo 1 è stata somministrata una soluzione orale al 2% di miltefosina (Milteforan®, Virbac), alla dose di 2 mg/kg di peso corporeo una volta al giorno, per 28 giorni consecutivi (1 ml/10 kg al giorno). Agli animali del gruppo 2 è stata sommini-

TABELLA 2
Schema dello studio

Giorno	Azioni
G -4	Pesata – Esame fisico completo Randomizzazione e formazione dei gruppi
G -1	Esame fisico completo Esame del sangue (esame emocromocitometrico e biochimico completo) Esame delle urine Biopsia renale
Dal G0 al G27	Somministrazione di miltefosina nel pasto (Gruppo 1) Somministrazione di antimoniato di N-metilglucamina per via SC (Gruppo 2) Osservazione quotidiana
G6; G13; G21	Pesata – Esame fisico completo
G27	Pesata – Esame fisico completo Esame del sangue Esame delle urine
Dal G28 al G54	Osservazione quotidiana
G34; G41; G48	Pesata – Esame fisico completo
G55	Pesata – Esame fisico completo Esame del sangue Esame delle urine Biopsia renale

strata una preparazione a base di antimoniato di N-metilglucamina (Glucantime®, Merial) alla dose di 100 mg/kg di peso corporeo per via sottocutanea una volta al giorno per 28 giorni consecutivi (3,3 ml/10 kg al giorno). I cani sono stati osservati quotidianamente e controllati 10 volte nel corso dello studio. Alla visita di pre-inclusione, al giorno -4, i cani sono stati sottoposti ad esame clinico completo (esame obiettivo generale e particolare) e randomizzati. Lo stesso giorno gli animali sono stati pesati, e questa procedura è stata ripetuta settimanalmente fino alla fine dello studio. Tutti i cani sono stati sottoposti ad un esame clinico completo nei giorni -1, 6, 13, 21, 27, 34, 41, 48 e 55. Nei giorni -1, 27 e 55 è stato prelevato un campione di sangue dalla vena giugulare. Inoltre, un campione di urina è stato raccolto dalla vescica, tramite cistocentesi eco-guidata, prima della procedura biotica. Le analisi di routine effettuate hanno incluso ematologia (Ematocrito, Eritrociti, Piastrine, Emoglobina, Volume Corpuscolare Medio, Concentrazione Emoglobina Corpuscolare Media, Emoglobina Corpuscolare Media, Conta leucocitaria, Formula leucocitaria), biochimica (Urea, Creatinina, Proteine Totali, Albumina, Bilirubina Totale, Alanina-Amino-Transferasi, Fosfatasi Alcalina), sieroelettroforesi ed esame delle urine completo incluso rapporto proteine urinarie e creatinina urinarie (PU/CU). Tutti i campioni sono stati analizzati dallo stesso laboratorio (Vébiotel Laboratoire de Biologie Vétérinaire - Arcueil, Francia). Al giorno -1 e 55 è stata eseguita su tutti i cani, una biopsia renale ecoguidata in anestesia generale (Tabella 2). Dopo la valutazione clinica un catetere endovenoso (22G) è stato posizionato nella vena cefalica sinistra o destra e collegato a una linea di perfusione endovenosa necessaria per la fluido terapia (soluzione fisiologica, al tasso di infusione di 10 ml/kg/ora) e per l'induzione dell'anestesia.

L'anestesia è stata eseguita utilizzando l'associazione tiletamina/zolazepam (Zoletil 50®, Virbac), alla dose di 15 mg/kg per infusione endovenosa. Le biopsie sono state effettuate al rene sinistro il giorno -1, ed al rene destro nel giorno 55. Questo per evitare che la seconda biopsia potesse essere eseguita su tessuti danneggiati dalla procedura precedente. Per entrambe le procedure, il mantello è stato accuratamente tosato in un'area quadrangolare comprendente la regione della fossa del fianco e gli ultimi spazi intercostali dello stesso lato dell'organo, e la cute della zona preparata asepticamente per la biopsia renale. Tutte le biopsie sono state eseguite per via percutanea eco-assistita, impiegando aghi monouso da biopsia, Tru-cut® da 18G, manovrati da dispositivo automatico a molla^a. Due campioni biotici sono stati prelevati dal polo renale caudale di ogni cane e valutati immediatamente dal patologo, tramite microscopio stereoscopico. Per evitare la formazione di

coaguli ematici nella pelvi renale, la fluido terapia è stata mantenuta per circa 30 minuti dopo ogni biopsia, fino a completo risveglio del cane, mentre il polso femorale ed il tempo di riempimento capillare (CRT) venivano costantemente monitorati. Prima del termine della procedura, ogni paziente è stato controllato ecograficamente per rilevare eventuali segni di emorragia al sito biotico renale. Una volta che i cani risultavano completamente svegli e clinicamente normali, venivano ricondotti al loro box. Le due biopsie renali di ogni cane sono state suddivise in tre parti: una per la microscopia ottica, una per l'immunofluorescenza ed una per la microscopia elettronica. Tutte le biopsie renali sono state valutate presso il Dipartimento di Salute Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica dell'Università di Padova. Per l'esame in microscopia ottica, le biopsie renali venivano fissate in formalina tamponata, incluse in paraffina, e tagliate a 3 micron di spessore. Le sezioni seriali erano colorate con: Ematossilina Eosina, acido periodico di Schiff (PAS), fucsina acida e arancio G (AFOG), Tricromica di Masson, Ematossilina Fosfotungstica Acida (PTAH) ed elastina di Miller. I preparati istologici sono stati esaminati da tre patologi indipendentemente (LA; LC; MC), il consenso è stato utilizzato per conformare i dati discordanti. Il campione per l'immunofluorescenza diretta, comprendente 4 glomeruli, veniva immerso in gel OCT e congelato in azoto liquido a -80 °C. Successivamente, sezioni di 5 µm di spessore ottenute al criostato venivano fissate in acetone per 15 minuti; dopo un lavaggio con tampone fosfato salino (PBS) (due passaggi), le sezioni venivano incubate con anticorpi diretti contro IgA, IgG, IgM e complemento C3 specifici per il cane (Bethyl Laboratories INC, Montgomery USA). Gli anticorpi primari sono stati sostituiti con PBS come controllo negativo¹⁶. Per l'esame ultrastrutturale, sezioni ultrafini sono state tagliate da tessuto preservato in blocchetti di EPON, successivamente contro colorate con acetato di uranile e citrato di piombo, per poi essere esaminate con il microscopio elettronico Hitachi H-700.

RISULTATI

Parametri pre-trattamento Alla visita di pre-inclusione ed al giorno -1 i parametri clinici di tutti i cani sono risultati nella norma. Le analisi del sangue effettuate al giorno -1 su tutti i cani, non hanno mostrato valori al di fuori degli intervalli di riferimento. Al giorno -1 un soggetto del Gruppo 2 (H7I 1417) ha mostrato un PU/CU alterato, pari a 1,74 (normale = <0,5).

Peso corporeo. I cani del gruppo 1, hanno avuto un aumento di peso di 0,5 - 0,9 kg tra il giorno -4 ed

il giorno 55. Tre dei quattro cani del gruppo 2, hanno avuto un aumento di peso di 0,15 - 0,7 kg nel corso dello stesso periodo. Un cane del Gruppo 2 (H7E 0886) ha mostrato una perdita di peso di 0,15 kg tra il giorno -4 ed il giorno 55.

Risultati clinici. Complessivamente tutti gli animali sono rimasti clinicamente sani per tutto il periodo di studio. Due animali di ciascun gruppo hanno emesso feci poco formate per brevi periodi (un giorno) nel corso dello studio. Questi episodi non hanno avuto conseguenze sullo stato clinico del cane ed il trattamento non è stato interrotto. Aumenti dei valori di temperatura corporea (> 39,5 °C) sono stati registrati in un solo controllo dei 10 effettuati durante il periodo di osservazione, in 1 animale del Gruppo 1 (H7I 1401) e in due animali del Gruppo 2 (H7G 1329, H7F 1076) in entrambi i gruppi, senza alcuna correlazione con gli episodi dissenterici e con una temperatura massima di 39,7 °C.

Esami del sangue. Gli esami del sangue effettuati il giorno 27 non hanno mostrato alcun valore al di fuori degli intervalli di riferimento. Al giorno 55 un cane nel gruppo 2 (H7E 0886) ha mostrato un valore di urea lievemente aumentato (0,8 g/l; intervallo di riferimento: 0,2 - 0,6 g/l).

Esame delle urine. L'analisi delle urine effettuata il giorno 27 ha evidenziato l'aumento dei livelli di proteine (contenuto nell'intervallo fra 0,35 e 0,61 g/l; intervallo di riferimento: 0 - 3 g/l) nelle urine, a cui corrispondeva un normale valore del rapporto PU/CU (<0,5) e valori di peso specifico entro gli intervalli di riferimento (intervallo fra 1025 e 1050: al refrattometro) in 2 cani per gruppo (H7F 1144; H7G 1342 e H7F 1076; H7E 0886), mentre tutti gli altri parametri sono rimasti all'interno del normale intervallo di riferimento. All'esame effettuato il giorno 55, 3 degli stessi 4 cani (H7F 1144, H7G 1342 e H7F 1076) hanno mostrato ancora un aumento della proteinuria (intervallo fra 0,47 e 0,77 g/l) pur mantenendo un normale rapporto PU/CU, ed un peso specifico entro il normale intervallo di riferimento ed in assenza di altre anomalie rilevabili.

Esame istologico

Il campionamento per la microscopia ottica è risultato adeguato in tutte le biopsie esaminate, con una media di 17,4 glomeruli per biopsia (intervallo: 10 - 36 glomeruli). La microscopia ottica ha mostrato glomeruli e tubuli nella norma in tutti gli otto cani valutati nell'esame al giorno -1. Dopo 55 giorni, i due gruppi trattati con i due farmaci hanno mostrato caratteristiche istologiche differenti. I cani trattati con miltefosina presentavano glomeruli nei limiti di norma e minime vacuolizzazioni delle cellule epiteliali tubulari prossimali a distribuzione multifocale. Il compartimento vascola-

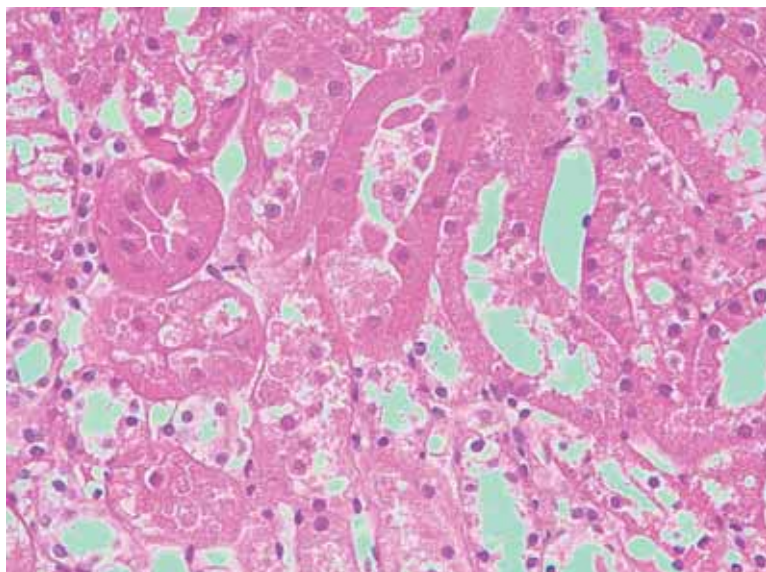


FIGURA 1 - Cellule tubulari esfoliate presenti nel lume tubulare e foci di necrosi tubulare con presenza di nuclei picnotici. 400x E.e.

re era nella norma. I quattro cani trattati con meglumine antimonio presentavano un pattern glomerulare nei limiti della norma mentre il compartimento tubulare era alterato in tutti i cani di questo gruppo. Le principali lesioni erano caratterizzate da un diffuso rigonfiamento delle cellule epiteliali tubulari con citoplasma ampio ed in aree multifocali erano presenti foci di necrosi coagulativa. Cellule epiteliali tubulari esfoliate erano evidenti a livello del lume di alcuni tubuli, in associazione a necrosi tubulare acuta di singole cellule (Fig. 1). Segni di apoptosi erano evidenti in cellule epiteliali tubulari sparse (Figg. 2 - 3). Edema interstiziale focale con minimo infiltrato infiammatorio mononucleare associato a tubulite era presente a livello interstiziale.

L'esame di immunofluorescenza diretta per la ricerca di IgG, IgM, IgA e complemento C3 è risultato negativo in entrambi i gruppi sia prima che successivamente al trattamento.

L'esame ultrastrutturale ha confermato il grave danno tubulare osservato nei cani trattati con meglumine-antimonio (Fig. 4). Le cellule epiteliali tubulari prossimali mostravano una diffusa esfoliazione con denudamento della membrana basale tubulare. Le cellule rimanenti presentavano dilatazione apicale con aumento degli spazi intercellulari. Foci di necrosi cellulare singola e presenza di materiale citoplasmatico nel lume tubulare erano evidenti. Non erano presenti segni di rigenerazione. L'esame ultrastrutturale ha confermato l'assenza di danno nei cani trattati con miltefosina.

DISCUSSIONE

I reni risultano colpiti in tutti i cani affetti da LCan, tanto che la patologia renale può essere la sola

anomalia rilevabile. La malattia renale può iniziare con una proteinuria asintomatica fino a raggiungere la sindrome nefrosica o l'insufficienza renale cronica con glomerulonefrite associata a nefrite tubulointerstiziale ed amiloidosi¹⁷. Le lesioni glomerulari che si sviluppano nei cani durante l'infezione da *Leishmania* sono associate alla presenza di immunocomplessi⁶ e sono state classificate istologicamente come glomerulonefriti mesangiali, glomerulonefriti membranose, glomerulonefriti membranoproliferative e glomerulosclerosi segmentali focali¹⁸. La nefrite tubulointerstiziale è stata segnalata con incidenze diverse da differenti autori, tuttavia, nei cani affetti da LCan, non è mai stata osservata come lesione solitaria¹⁹. La presenza di lesioni tubulointerstiziali è generalmente considerata come una conseguenza della progressione delle lesioni glomerulari immunomediata che rappresentano classicamente le lesioni primarie²⁰. Nonostante l'elevata prevalenza di danno renale, l'aumento dei valori di creatinina e di urea sierica, a causa di insufficienza renale primaria, diventa rilevabile solo quando una percentuale elevata di nefroni risulta affetta²¹.

Le indicazioni riportate nell'etichetta della preparazione commerciale di antimonio di N-metilglucamina (Glucantime®) indicano come nei soggetti con insufficienza renale la posologia vada dimezzata e/o usata a giorni alterni. A parte questo, le informazioni disponibili sugli aspetti di tossicologia, di farmacocinetica e di farmacodinamica relativi all'impiego di questo farmaco nel cane, sono scarse. Uno specifico studio con antimonio di N-metilglucamina ha dimostrato che il comportamento farmacocinetico di questa molecola nei cani sani si differenzia notevolmente da quello descritto per l'uomo²². Questo e altri studi analoghi²³ hanno dimostrato che, nel cane, la via di somministrazione sottocutanea è la più adatta al fine di mantenere nel tempo alti livelli di antimonio (Sb) nel siero. Dopo somministrazione sottocutanea, la disponibilità del farmaco è risultata, in tali studi, vicina al 100%; la concentrazione massima di antimonio è stata raggiunta entro 3-5 ore, con un rapido calo della concentrazione del farmaco che ha raggiunto valori vicini al limite di rilevazione 18 ore dopo la somministrazione. L'emivita è risultata pari a 121 ± 6 minuti. L'antimonio di N-metilglucamina è stato riportato essere rapidamente eliminato dai reni nei cani sani, soprattutto tramite filtrazione glomerulare. Dopo iniezione sottocutanea, oltre l'80% del farmaco viene eliminato attraverso il filtro renale^{22, 23}. La valutazione dell'escrezione urinaria di Sb indica come i reni siano, quasi esclusivamente, la via di eliminazione dell'antimonio nell'uomo²⁴. Ciononostante non esistono linee guida specifiche per l'adeguamento del dosaggio di questo farmaco in corso di insufficienza renale. Anche se raramente, una evidente nefrotossicità è stata correlata a questo trattamento

nei pazienti umani, alcuni casi di insufficienza renale acuta dovuta a necrosi tubulare acuta, seguita da morte, sono stati riportati in pazienti umani a seguito dell'impiego di antimonio di N-metilglucamina²⁵. Nel ratto è stata valutata la funzione renale in corso di somministrazione di antimoniali pentavalenti: antimonio di N-metilglucamina (Glucantime®, Rhodia) o sodio stibogluconato (Pentostam®, Wellcome). Quando somministrati ad una dose equivalente a 30 mg di Sb (Glucantime® o Pentostam®) per ogni 100 g di peso corporeo al giorno per 30 giorni, sono stati osservati cambiamenti funzionali renali consistenti in alterazioni della capacità di concentrazione delle urine, il che suggerisce un'interferenza di questi farmaci nell'azione dell'ormone anti-diuretico sui tubuli distali e sui dotti collettori. L'alterazione nella capacità di concentrazione delle urine è reversibile dopo un periodo di sette giorni. Nessuna alterazione istopatologica significativa è stata osservata nei reni dei ratti trattati con questi due farmaci. Solo i ratti trattati con la dose maggiore di Pentostam® (200 mg/100 g corporeo / giorno) hanno mostrato alterazioni funzionali ed istopatologiche riferibili a necrosi tubulare acuta²⁶. Gli effetti avversi riportati nell'uomo a seguito di terapia con antimoniali comprendono: letargia, anoressia, nausea, orticaria, febbre, vomito, polmonite, formazione di ascessi, cardiotoxicità, epatotossicità e nefrotossicità²⁷. Nei cani i più comuni effetti avversi associati all'uso di antimonio di N-metilglucamina sono: apatia, anoressia, vomito, diarrea e dolore al sito di iniezione⁴, tuttavia la frequenza e la gravità di questi effetti negativi non sono noti^{28, 29, 30}.

L'impiego di miltefosina per il trattamento della LCan si è reso disponibile solo di recente e quindi sono poche le informazioni riguardanti il reale impatto sui reni di cani leishmaniotici nel campo. Diversi studi di farmacocinetica sono stati condotti con miltefosina negli animali di laboratorio e nella specie di destinazione. La concentrazione di miltefosina è stata determinata nel plasma, nelle urine e nelle feci di cani trattati con tale farmaco per mezzo di analisi in HPLC-MS/MS (cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa tandem)^{31, 32}. Nei ratti e nei cani la miltefosina ha mostrato una biodisponibilità assoluta dell'82% e del 94%, rispettivamente, con un tempo di raggiungimento della concentrazione massima (T_{max}) variabile tra le 4 e le 48 ore.

Nei cani dopo ripetute somministrazioni orali di miltefosina nel cibo per 28 giorni, la clearance plasmatica è risultata di $3,40 \pm 0,447$ ml/kg/h, corrispondente ad un tasso di eliminazione corporea complessivo di circa 0,06% in un cane di 10 kg. Questo suggerisce che nei cani l'efficacia metabolica di trasformazione di miltefosina in differenti metaboliti è scarsa e non si assiste ad un primo passaggio metabolico epatico. L'emivita nei cani è

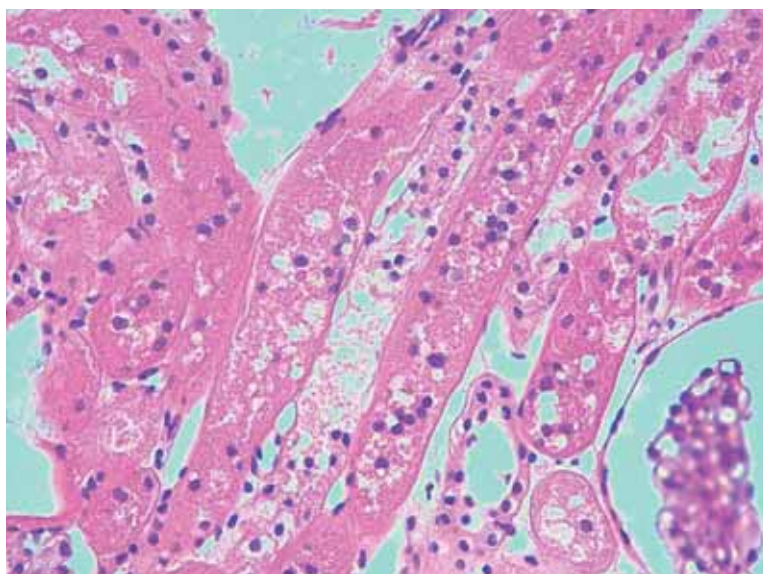


FIGURE 2, 3 - Diffusa esfoliazione di cellule epiteliali tubulari e cilindri granulari proteici con residui necrotici cellulari. 400x E.e.

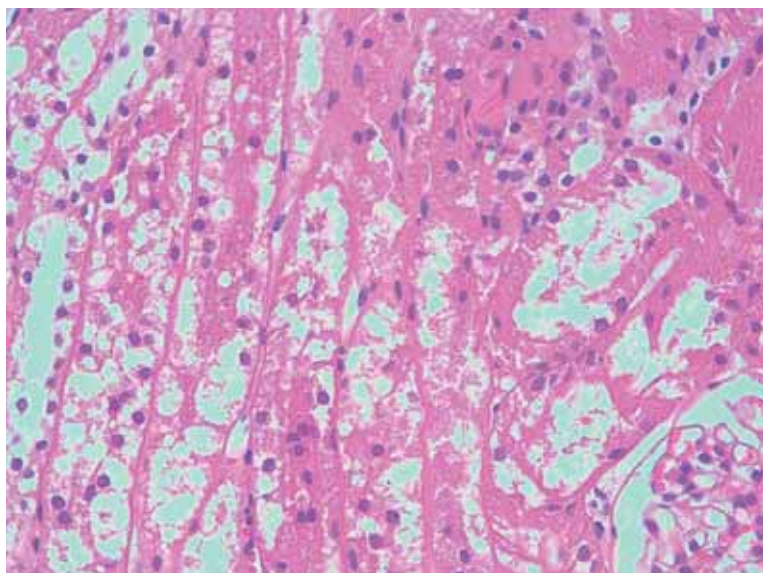


FIGURA 3

risultata approssimativamente di 153 ore ($153 \pm 13,7h$) equivalente a 6,3 giorni. Questa lunga emivita può essere spiegata dalla bassa clearance plasmatica di miltefosina. Considerando questa prolungata emivita nei cani ci si può aspettare il raggiungimento di un "equilibrio dinamico" dopo circa 3 - 4 settimane di somministrazioni giornaliere di miltefosina. Nei cani ripetute somministrazioni di 2 mg/kg/die di miltefosina per 28 giorni portano infatti ad un aumento della concentrazione plasmatica di miltefosina entro le prime due settimane di trattamento, con raggiungimento di un equilibrio dinamico fino alla fine del trattamento (28 giorni). Al termine del trattamento c'è una lenta e lineare diminuzione della miltefosina plasmatica con completa eliminazione in ulteriori 4 settime-

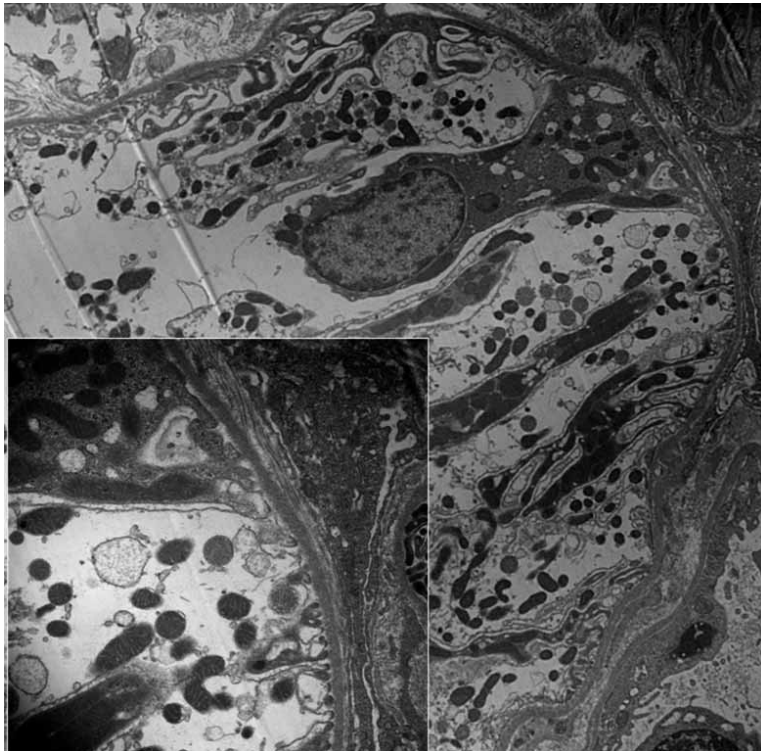


FIGURA 4 - Microscopia elettronica. Necrosi cellulare individuale con distacco dalla membrana basale tubulare. 12.000x

ne. La miltefosina si distribuisce ampiamente nel corpo e subisce un lento metabolismo nel fegato a colina (un composto naturale) e a metaboliti contenenti colina. La miltefosina viene solo parzialmente escreta nelle feci. Il contributo della clearance fecale alla clearance corporea totale è stato di $10 \pm 4,86\%$ e questo significa che solo circa il 10% della dose somministrata per via parenterale viene eliminata nelle feci (i.e. circa 200 $\mu\text{g/kg/die}$) mentre l'eliminazione del rimanente 90% circa avviene, come detto, dopo un estensivo ma lento metabolismo epatico. Le concentrazioni urinarie di miltefosina sono risultate piuttosto basse ed al di sotto dei limiti di quantificazione (20 ng/ml di miltefosina) dopo 3 giorni di somministrazione. Il contributo della clearance renale alla clearance corporea totale è stato considerato trascurabile (circa 0,03%). Questi risultati suggeriscono che la via urinaria rappresenta nel cane solo una via di eliminazione minore dopo somministrazione orale di miltefosina. Come negli esseri umani, gli effetti collaterali indotti dalla miltefosina nei cani sono per la maggior parte di tipo gastro-intestinale, come vomito e diarrea occasionale. Questi sono dose-dipendenti e alla dose raccomandata (2 mg/kg/die) sono generalmente lievi e transitori, scomparendo generalmente senza necessità di interventi terapeutici^{33,34}.

I risultati di questo studio confermano come, l'impatto sui normali parametri clinici così come sulla struttura anatomica e sulla funzionalità renale dei cani sottoposti ad un trattamento standard con

miltefosina sia limitato. L'unico valore clinico anormale è stato riferito ad un anormale rapporto PU/CU in un cane del gruppo 2 (PU/CU = 1,74) durante la visita di pre-inclusione, che può essere spiegato come dovuto alla contaminazione ematica dei campioni di urina durante il prelievo per cistocentesi. L'esame istologico in questi cani ha mostrato glomeruli normali e minime vacuolizzazioni delle cellule epiteliali prossimali. Nessun reperto è stato identificato a livello di esame ultrastrutturale e di immunofluorescenza. Al contrario, seppur senza alcuna evidenza clinica di coinvolgimento renale, tutti i cani trattati con antimonio di N-metilglucamina hanno mostrato cambiamenti morfologici coerenti con un grave danno tubulare. Difatti, diffuso rigonfiamento cellulare e aree multifocali di necrosi coagulativa delle cellule epiteliali tubulari prossimali erano evidenti in questo gruppo. L'esame ultrastrutturale ha semplicemente confermato la presenza di necrosi cellulare singola con nuclei picnotici e detriti citoplasmatici all'interno del lume tubulare. Questi gravi danni sono risultati evidenti al prelievo biotico del giorno 55 e dunque 4 settimane dopo la fine della terapia, senza segni di rigenerazione dei tessuti danneggiati. In conclusione, anche se in assenza di segni clinici evidenti, l'uso di antimonio di N-metilglucamina nell'approccio terapeutico di cani affetti da LCan, potrebbe risultare fonte di ulteriore aggravamento delle lesioni già presenti. Questa ipotesi tuttavia, necessita di ulteriori approfondimenti e conferme.

Parole chiave

Leishmania; cani; rene; miltefosina; antimonio di N-metilglucamina; effetti collaterali.

■ Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy Beagle dogs: clinical and histopathological evaluation of the impact on the kidneys

Summary

In Canine leishmaniosis (CanL) kidneys are affected in virtually all dogs. Treatment of CanL is limited in Europe to two registered drugs: meglumine antimoniate and miltefosine. This study evaluated the clinical, toxicological and pathological effects of both drugs in eight healthy Beagle dogs divided into two groups. The animals in Group 1 were administered an oral solution of 2% of miltefosine at 2 mg/kg body weight (b.w.) orally once a day, for 28 days. The animals in Group 2 were administered a preparation of meglumine antimoniate at 100 mg/kg b.w. subcutaneously once a day for 28 days. After treatment, all dogs were followed-up for a further 28 days. Dogs were observed daily

and underwent a complete clinical examination 10 times throughout the study. At days -1 and 55 an ultrasound guided renal biopsy was performed on all dogs and analysed by optical microscopy, immunofluorescence and electron microscopy. All the examinations failed to demonstrate any lesions in the miltefosine treated dogs. Conversely, all the meglumine antimoniate treated dogs demonstrated a diffuse tubular damage. In conclusion, although no clinical signs of renal disease were evident, the use of meglumine antimoniate in the therapeutic approach of CanL affected dogs could be a source of further aggravation of the lesions already present. This hypothesis requires, however, further investigation and confirmation.

Key words

Leishmania; dogs; kidney; miltefosine; meglumine antimoniate; side effects.

Gli Autori del presente articolo dichiarano la non esistenza di conflitti di interesse di alcun genere riguardanti il presente articolo.

Abbreviazioni e note nel testo:

^a *Magnum® Bard*

LA: Luca Aresu

LC: Laura Cavicchioli

MC: Massimo Castagnaro

BIBLIOGRAFIA

- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso: Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009 Jun 6. [Epub ahead of print]
- Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, et al: A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 141, 539–543, 1997.
- Baneth G.: Leishmaniasis. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3rd edn.) (Greene CE, ed.), pp 685–698, Saunders, 2006.
- Baneth G, Shaw SE.: Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2;106 (4):315-24. Review, 2002.
- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, et al: Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet. Pathol.* Nov;40 (6):677-84, 2003.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela MA.: Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 45, 33–47, 1992.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, et al: Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24 (8):371-7, 2008.
- Hilgard P, Klenner T, Stekar J, et al: Alkylphosphocholines: a new class of membrane active anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32:90–95, 1993.
- Jha TK, Sunder S, Thakur CP, et al: Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 341:1795–1800, 1999.
- Pearson RD.: Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 5:41–42, 2003.
- Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, et al: Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* 352:1821–1823, 1998.
- Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, et al: Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93:589–597, 1999.
- Verma NK, Dey CS.: Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(8):3010-5, 2004.
- Mateo M, Maynard L, Vischer C, et al: Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res* 2009 Jul;105(1):155-62. Epub 2009 Feb 24.
- Miró G, Oliva G, Cruz I, et al: Multi-centric and controlled clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the combination of miltefosine and allopurinol in the treatment of canine leishmaniosis. *Vet Derm.* 19 (Suppl. 1), 1-83 [Abstract], 2008.
- Aresu L, Pregel P, Cavicchioli L, et al: Valore diagnostico dell'esame di immunofluorescenza nelle biopsie renali nel cane. *Veterinaria*, anno 22, n. 4, Agosto 2008.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, et al: Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989 –1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 376–383, 1999.
- Aresu L, Pregel P, Bollo E, et al: Immunofluorescence staining for the detection of immunoglobulins and complement (C3) in dogs with renal disease. *Vet Rec.* Dec 6;163(23):679-82, 2008.
- Aresu L, Rastaldi MP, Pregel P, et al: Dog as model for down-expression of E-cadherin and beta-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. *Virchows Arch.* Dec;453(6):617-25, Epub Oct 24, 2008.
- Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, et al: Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res.* 64 (5):558-61, 2003.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, et al: Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* Jul;24 (7):324-30, 2008.
- Tassi P, Ormas P, Madonna M, et al: Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci.* 56(2):144-50, 1994.
- Belloli C, Ceci L, Carli S, et al: Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 58(2):123-7, 1995.
- Hantson P, Luyasu S, Haufroid V, et al: Antimony excretion in a patient with renal impairment during meglumine antimoniate therapy. *Pharmacotherapy.* 20(9):1141-3, 2000.
- Rodrigues ML, Costa RS, Souza CS, et al: Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41(1):33-7, 1999.
- Veiga JP, Khanam R, Rosa TT, et al: Pentavalent antimonial nephrotoxicity in the rat. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 32(4):304-9, 1990.
- Davidson RN.: Practical guide for treatment of leishmaniasis. *Drugs.* 56, 1998, pp 1009-1018.
- Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Ciarlini PC, et al: Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci.* 83 (1):105-8, 2007.
- Bravo L, Frank LA, Brenneman KA.: Canine leishmaniasis in the United States. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 15, 699–708, 1993.
- Noli C.: Leishmaniosis canina. *Waltham Focus* 9, 16–24, 1999.
- Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.010000-60010
- Virbac Data On File, European Registration Dossier: Study No. F-107.000000-40027
- Toutain PL.: Expert Report: Study of the pharmacokinetics of miltefosine in plasma, urine and faeces of dogs after oral repeated administrations of miltefosine in food for 28 days: Pharmacokinetic Analysis Report, Virbac File, 2006.
- Berman JJ.: Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 . *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 Sep;4(9):1209-16. Review