

D. Sabaté et al. / Preventive Veterinary Medicine 115 (2014) 56-63

Ensayo clínico controlado, aleatorizado, abierto y monocéntrico para valorar la eficacia preventiva de una pauta de tratamiento basada en domperidona frente a la leishmaniosis canina clínica en un área de alta prevalencia.

David Sabaté^{a,*}, Jorge Llinás^b, Josep Homedes^a, Mariano Sust^c, Lluís Ferrer^d

^aDepartamento de Investigación y Desarrollo, ESTEVE veterinaria, Lab. Dr. ESTEVE, S.A. Avda. Mare de Déu de Montserrat 221, CP 08041 Barcelona, España

^bHospital Veterinaria Valencia Sur, Av. Picassent 28, CP 46460 Silla, Valencia, España

^cDepartamento de Investigación Clínica, Lab. Dr. ESTEVE, S.A. Avda. Mare de Déu de Montserrat 221, CP 08041 Barcelona, España

^dDepartamento de Ciencias Clínicas, Tufts Cummings School of Veterinary Medicine, 200 Westboro Road, North Grafton, MA 01536, Estados Unidos

RESUMEN

Es sabido que la respuesta inmune innata que actúa inmediatamente después de la infección inicial por parásitos de *Leishmania* desempeña un papel relevante en la prevención de la progresión clínica de la enfermedad. La domperidona es un antagonista del receptor D2 de la dopamina que ha demostrado aumentar la respuesta inmune innata mediada por células.

El objetivo de este estudio fue valorar la eficacia preventiva de una pauta de tratamiento basada en domperidona frente a la leishmaniosis canina clínica (Lcan) en un área de alta prevalencia. El estudio se realizó con 90 perros sanos seronegativos de diferente sexo, edad, peso y raza en una única clínica veterinaria ubicada en Valencia (España). Los perros se asignaron por aleatorización a dos grupos. Los perros de uno de los grupos (grupo tratado con domperidona; $n = 44$) recibieron una suspensión oral de domperidona a una dosis de 0,5 mg/kg pc/día durante 30 días consecutivos, cada 4 meses. Los perros del otro grupo (grupo de control negativo; $n = 46$) no fueron tratados. Se estableció un periodo de seguimiento de 21 meses que cubría dos fases estacionales del vector flebotomo. Durante este periodo todos los animales fueron periódicamente sometidos a exploraciones clínicas y a extracción de muestras de sangre para pruebas serológicas anti-*Leishmania*. Los perros seropositivos a *Leishmania* (título de anticuerpos IFAT $\geq 1:80$) que además presentaban al menos un signo clínico indicativo de Lcan (indicativo de infección activa y progresión incipiente de la enfermedad) fueron clasificados como 'fracaso de la prevención'. Dichos perros se retiraron del estudio tras confirmar la infección por observación directa del parásito en frotis de aspirados de ganglio linfático y/o médula ósea.

El porcentaje acumulado de 'fracaso de la prevención' al cabo de 12 meses fue significativamente menor en el grupo tratado con domperidona que en el grupo de control negativo (7% frente a 35%, $p=0,003$). Las diferencias entre grupos se mantuvieron al cabo de 21 meses (11% frente a 48%, $p=0,001$). La tasa de prevención obtenida con domperidona fue del 80% durante los primeros 12 meses y del 77% durante el periodo de seguimiento total de 21 meses, con razones de posibilidades (odds ratios) de 7,3 ($p=0,001$) y 7,15 ($p=0,001$), respectivamente, lo cual indica que el riesgo de que los perros tratados con domperidona desarrollaran la enfermedad era unas 7 veces inferior al de los perros no tratados.

Los resultados de este estudio demuestran que la instauración de una pauta de tratamiento basada en domperidona consistente en tratamientos de 30 días con domperidona repetidos cada 4 meses reduce eficazmente el riesgo de desarrollar Lcan clínica en áreas de alta prevalencia.

Palabras clave: Domperidona – Leishmaniosis canina – Prevención – Ensayo clínico de eficacia.

Información sobre el artículo: recibido el 4 de noviembre 2013, recibido en forma revisada el 3 de marzo 2014, aceptado el 12 de marzo 2014.

*Autor correspondiente: Tel.: +34 934466000 – Correo electrónico: dsabate@esteve.es (D. Sabaté).

1. Introducción

La leishmaniosis canina (Lcan) es una enfermedad zoonótica causada por un protozoo parásito (*Leishmania infantum* o su sinónimo en el Nuevo Mundo *Leishmania chagasi*) que se transmite a través de la picadura de un vector flebotomo. Los perros domésticos infectados constituyen el mayor reservorio del parásito y desempeñan un papel clave en la transmisión a humanos, en quienes la infección causa leishmaniosis visceral (Alvar y col., 2004; Gramiccia y Gradoni, 2005; Maroli y col., 2012). La Lcan se halla presente en varias zonas del sur de Europa, África, Asia, Centroamérica y Sudamérica (Baneth y col., 2008) y ha sido recientemente notificada en áreas previamente no endémicas del norte de Europa, sur de Canadá y desde el norte de Argentina hasta el norte de Estados Unidos (Maroli y col., 2008; Otranto y col., 2009; Chamaille y col., 2010; Petersen y Barr, 2009; Mencke, 2011; Dantas-Torres y col., 2012). La expansión de la leishmaniosis humana y canina desde zonas endémicas a zonas no endémicas se ha atribuido a la propagación geográfica de los vectores flebotomos debido al calentamiento global, entre otras causas (Ferroglio y col., 2005; Shaw y col., 2009; Dantas-Torres y col., 2012). Recientemente se ha propuesto un abordaje médico-veterinario unificado para evitar la propagación de la leishmaniosis visceral a nuevas zonas del planeta como consecuencia del calentamiento global. La prevención de la enfermedad en los perros es una de las principales líneas de actuación de este abordaje (Reis y col., 2010; Palatnik-de-Sousa y Day, 2011).

Durante varias décadas, las estrategias de prevención frente a Lcan se han centrado en el uso de productos veterinarios registrados que contienen piretroides sintéticos, permetrina o deltametrina con efecto repelente contra los flebotomos (Maroli y col., 2010; Solano-Gallego y col., 2011). En Brasil se comercializa desde principios de los 2000 una vacuna basada en ‘ligando fructosa-manosa’ (FML). Más recientemente, se ha aprobado una vacuna basada en la proteína A2 recombinante y otra vacuna basada en cultivos de antígenos excretados/secretados purificados de *L. infantum* para uso en perros en Brasil y Europa, respectivamente (Solano-Gallego y col., 2011). En varios países europeos también se ha aprobado un producto basado en domperidona para reducir el riesgo de desarrollar infección activa y enfermedad clínica en caso de contacto con *L. infantum*, así como para controlar la progresión clínica de Lcan en las fases iniciales de la enfermedad (HMA, 2013).

La domperidona es un antagonista del receptor D2 de la dopamina desarrollado en la década de los 70 como agente procinético y antiemético (Prakash y Wagstaff, 1998; Barone, 1999). Además de estos efectos, la domperidona tiene un efecto inmunomodulador, principalmente mediante un aumento reversible de los niveles de prolactina en sangre (Rovensky y col., 1995, 1996, 1999). La prolactina es una hormona neuroendocrina producida principalmente por la glándula pituitaria y ampliamente conocida por su acción estimuladora del sistema inmunitario como citocina proinflamatoria derivada de linfocitos (Reber, 1993; Hinterberger-Fischer, 2000; Vera-Lastra y col., 2002; Chavez-Rueda y col., 2005; Kelley y col., 2007). Concretamente, se ha demostrado que una elevación de los niveles de prolactina en sangre induce un aumento en los subgrupos CD4+Th1 y en la liberación de interleucina (IL)-2, IL-12, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , lo cual lleva a una activación de los linfocitos citolíticos naturales (*natural killer cells*, NK) y de los macrófagos, seguida por una reducción de los subgrupos CD4+Th2 y TNF- β (Di Carlo y col., 1993; Richards y col., 1998; Majumder y col., 2002).

En la Lcan se sabe que la resistencia a la progresión de la enfermedad se asocia a una respuesta inmune mediada por células CD4+Th1, mientras que la susceptibilidad a la enfermedad clínica se asocia a una alta respuesta inmune humoral mediada por CD4+Th1 (Paltrinieri y col., 2010; Solano-Gallego y col., 2011). A través de su efecto estimulador de la respuesta inmune mediada por células Th1, la domperidona ayuda a los perros con Lcan a controlar y a reducir los signos clínicos y los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania*, particularmente en las fases iniciales de la enfermedad (Gómez-Ochoa y col., 2009).

En perros seronegativos clínicamente sanos, la administración repetida de domperidona ha demostrado inducir un aumento significativo del porcentaje de células fagocíticas polimorfonucleares activadas implicadas en la respuesta inmune innata, como los neutrófilos y los macrófagos (Gómez-Ochoa y col., 2012). Estas células constituyen la primera línea de defensa que encuentran los parásitos de *Leishmania* cuando penetran en el hospedador susceptible. Así, tras la infección inicial, los neutrófilos y los macrófagos, entre otros, son reclutados al lugar de la infección y la interacción entre ellos y con los parásitos influyen significativamente sobre el resultado de la infección (Novais y col., 2009; Ribeiro-Gomes y Sacks, 2012). Una activación apropiada de estas poblaciones celulares es crucial para la rápida eliminación de los parásitos fagocitados y la posterior presentación de antígenos por las células dendríticas (Bonilla-Escobar, 2005; Liu y Uzonna, 2012).

En base a lo anterior, al activar las células fagocíticas polimorfonucleares implicadas en la respuesta inmune innata, la domperidona podría hipotéticamente controlar la infección inicial por parásitos de *Leishmania* y prevenir la progresión de la enfermedad. El presente ensayo clínico se realizó para contrastar esta hipótesis en condiciones de campo reales en un área de alta prevalencia. El estudio se llevó a cabo con la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

Los resultados de este estudio fueron parcialmente presentados en el ‘Southern European Veterinary Conference (SEVC) – 46 Congreso Nacional de AVEPA’, Barcelona, 2011.

2. Métodos

2.1. Diseño del ensayo

Este fue un ensayo clínico controlado, aleatorizado, abierto y monocéntrico con razón de asignación 1:1 realizado en una clínica veterinaria ubicada en Silla, Valencia (España), un área con una elevada seroprevalencia de Lcan (aprox. 20%) (Miró y col., 2013) y una larga estación del vector (estimada de marzo a noviembre).

2.2. Reclutamiento de perros

En el estudio se reclutó a noventa perros de propiedad privada. Todos los perros vivían en la zona de la clínica veterinaria, en un radio de 20 km. Las visitas de selección se realizaron entre junio y principios de agosto de 2007.

Los criterios de elegibilidad fueron los siguientes: (a) perros de diferente sexo, edad, peso y raza con estado clínico normal confirmado por exploración clínica en la visita de selección; (b) serológicamente negativos a *L. infantum* (técnica de inmu-

nofluorescencia indirecta, IFAT < 1:40) en base a una muestra de sangre obtenida en la visita de selección y analizada en un laboratorio veterinario de referencia (IDEXX Laboratories, Inc.); y (c) cuyos propietarios no usaban voluntariamente productos que contuvieran piretroides sintéticos, permetrina o deltametrina con efecto repelente específico contra flebotomos como prevención contra Lcan. En vez de ello, en el momento de su inclusión los perros estaban siguiendo un plan de detección precoz de la enfermedad basado en exploraciones clínicas y pruebas serológicas periódicas, un plan que se mantuvo durante el estudio.

El propietario de cada perro firmó un consentimiento informado antes de la inclusión del animal en el estudio. Los propietarios también se comprometieron a administrar el producto y realizar el seguimiento en base a las indicaciones del veterinario.

2.3. Asignación a los grupos

Los perros que cumplían los criterios de elegibilidad fueron asignados secuencialmente por el veterinario a dos grupos (grupo tratado con domperidona y grupo de control negativo) mediante lista aleatoria simple previamente generada por nQueryAdvisor.

2.4. Tratamientos

Los perros del grupo tratado con domperidona recibieron una suspensión oral de domperidona (Leisguard®, Lab. Dr. ESTEVE, S.A.) a una dosis de 0,5 mg/kg pc/día durante 30 días consecutivos, cada 4 meses, iniciando el primer tratamiento inmediatamente después de la inclusión en el estudio. Los propietarios comprobaron la toma del producto en cada administración y la anotaron en un registro de tratamiento diario. En ausencia de un producto de referencia comparable registrado en España en el momento del estudio, los perros del grupo de control negativo no se trataron. No se permitió el uso de productos con efecto repelente específico contra flebotomos. Se registró la administración de cualquier otro producto a los perros de ambos grupos durante el estudio para evaluar posibles interferencias con los resultados.

2.5. Seguimiento

Se fijó un periodo de seguimiento de 21 meses para cada perro, siendo el día 0 el día del reclutamiento. Este periodo cubrió dos fases estacionales completas del vector flebotomo. Durante este periodo se realizaron visitas periódicas a la clínica veterinaria para exploración clínica y pruebas serológicas (media de 4 visitas de seguimiento por animal). En cada visita se sometió a los perros a exploración clínica completa y extracción de una muestra de sangre para pruebas serológicas IFAT (IFAT para anticuerpos de *Leishmania*, IDEXX Laboratories, Inc.). Esta prueba proporciona una especificidad y una sensibilidad del 98,6% y 99,1%, respectivamente. Los perros seropositivos a *Leishmania* (título de anticuerpos \geq 1:80) que además presentaban al menos un signo clínico indicativo de Lcan (indicativo de infección activa y progresión incipiente de la enfermedad) fueron clasificados como 'fracaso de la prevención'. En caso de 'fracaso de la prevención' se retiró al perro del estudio y se inició el tratamiento terapéutico indicado por el veterinario. En estos perros se utilizaron frotis de aspirados de ganglio linfático y/o médula ósea teñidos con Diff-Quick para observación directa de los amastigotes de *Leishmania*.

Durante todo el periodo de seguimiento se prestó especial atención a los perros del grupo tratado con domperidona para detectar posibles acontecimientos adversos relacionados con el fármaco, como episodios de alteraciones gastrointestinales o galactorrea, manteniendo un estrecho contacto telefónico con los propietarios.

2.6. Variables del estudio

La variable principal de evaluación fue el número de perros retirados del estudio debido a 'fracaso de la prevención' al final del periodo de seguimiento de 21 meses. Se valoró la incidencia acumulada de 'fracaso de la prevención' (porcentajes con respecto al número inicial de perros en el grupo). También se evaluaron como variable secundaria los resultados obtenidos al final del periodo de seguimiento de 12 meses. La tasa de prevención se calculó como sigue: $100 - ([\text{porcentaje de 'fracaso de la prevención' en el grupo de tratamiento} \times 100] / \text{porcentaje de 'fracaso de la prevención' en el grupo control})$.

2.7. Procedimientos estadísticos

La unidad experimental del estudio fue el perro. El cálculo del tamaño de la muestra se basó en la suposición de un 70% de incidencia acumulada de 'fracaso de la prevención' en el grupo no tratado durante el periodo de seguimiento de 21 meses. Una reducción del 30% de este porcentaje se consideró clínicamente relevante. Se necesitaría una muestra de 42 perros por grupo para tener un poder estadístico del 80% para detectar esta diferencia en la variable principal mediante una prueba χ^2 de Pearson con nivel alfa bilateral = 0,05. El tamaño de muestra se calculó mediante el software nQueryAdvisor.

El análisis de homogeneidad entre grupos de las características basales se realizó mediante la prueba t de Student o la prueba χ^2 de Pearson, en función del tipo de variable. Tanto la variable principal como la secundaria se analizaron mediante la prueba χ^2 de Pearson al cabo de un seguimiento de 21 meses y 12 meses, respectivamente (es decir, después de dos estaciones y de una estación completa del flebotomo, respectivamente). Se utilizó el método de Mantel-Haenszel para ajustar las variables principal y secundaria a las covariables basales no equilibradas.

Para ambas variables principal y secundaria se calcularon estimaciones de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo, y las diferencias entre curvas se valoraron con una prueba del orden logarítmico. Se utilizó un modelo de regresión de Cox para ajustar los resultados a las covariables basales no equilibradas. También se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* de los perros clasificados como 'fracaso de la prevención' en cada grupo. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete de software SAS 9.2 con un nivel de significación alfa bilateral = 0,05.

3. Resultados

3.1. Flujo de participantes

De los 90 perros incluidos en el estudio, 44 fueron asignados al grupo tratado con domperidona y 46 al grupo de control negativo (Fig. 1). Durante el estudio se retiró a 10 perros por motivos distintos a 'fracaso de la prevención' (8 perros porque sus propietarios se trasladaron y no podían continuar con el

seguimiento y 2 perros por muerte debida a fibrosarcoma y linfosarcoma, respectivamente). En el momento de su retirada, todos estos perros eran seronegativos a *Leishmania*. Por otra parte, al final del estudio se había retirado a un total de 27 perros debido a 'fracaso de la prevención', mientras que los 53 perros restantes eran seronegativos a *Leishmania* y no presentaban signos clínicos relacionados con Lcan. Durante el análisis de los datos de los perros retirados durante el estudio, incluidos los perros retirados por motivos distintos a 'fracaso de la prevención', se utilizó el método de imputación de la última observación considerada. Por consiguiente, para el análisis estadístico de las variables principal y secundaria se utilizaron los datos de todos los perros incluidos en el estudio.

3.2. Homogeneidad basal

Como muestra la **Tabla 1**, las características de los perros registradas durante su reclutamiento eran similares en ambos grupos, salvo en lo que respecta a las condiciones de alojamiento, ya que **la proporción de perros que vivían principalmente al aire libre y dormían en su caseta en el jardín fue significativamente más elevada en el grupo tratado con domperidona**. Por tanto, se ajustó esta covariable en los análisis estadísticos de los resultados para comprobar el posible impacto de este desequilibrio.

3.3. Hallazgos serológicos y clínicos

Durante el periodo de seguimiento de 21 meses, 27 perros (5 de los 44 del grupo tratado con domperidona y 22 de los 46 del grupo de control negativo) presentaron títulos de anticuerpos $\geq 1:0$. Puesto que todos ellos también presentaron signos clínicos indicativos de la enfermedad, fueron clasificados como 'fracaso de la prevención'. Los signos clínicos más frecuentes observados en estos perros fueron linfadenopatía periférica leve a moderada, dermatitis exfoliativa y pérdida de peso. En todos los casos la infección fue confirmada por observación directa del parásito en frotis de aspirados de ganglio linfático y/o médula ósea. Por otra parte, 6 perros (4 del grupo tratado con domperidona y 2 del grupo de control negativo) presentaron títulos de anticuerpos = 1:40 sin signos clínicos, mientras que el resto de perros presentó títulos < 1:40 sin signos clínicos.

En los perros clasificados como 'fracaso de la prevención', los del grupo tratado con domperidona presentaron títulos menores de anticuerpos que los del grupo de control negativo (prueba U de Mann-Whitney, $p = 0,056$). Concretamente, en el grupo tratado con domperidona cuatro perros presentaron un título de 1:80 y otro perro un título de 1:640, mientras que en el grupo de control negativo cuatro perros presentaron un título de 1:80, cinco un título de 1:160, cuatro un título de 1:320, ocho un título de 1:640, y uno un título de 1:1280.

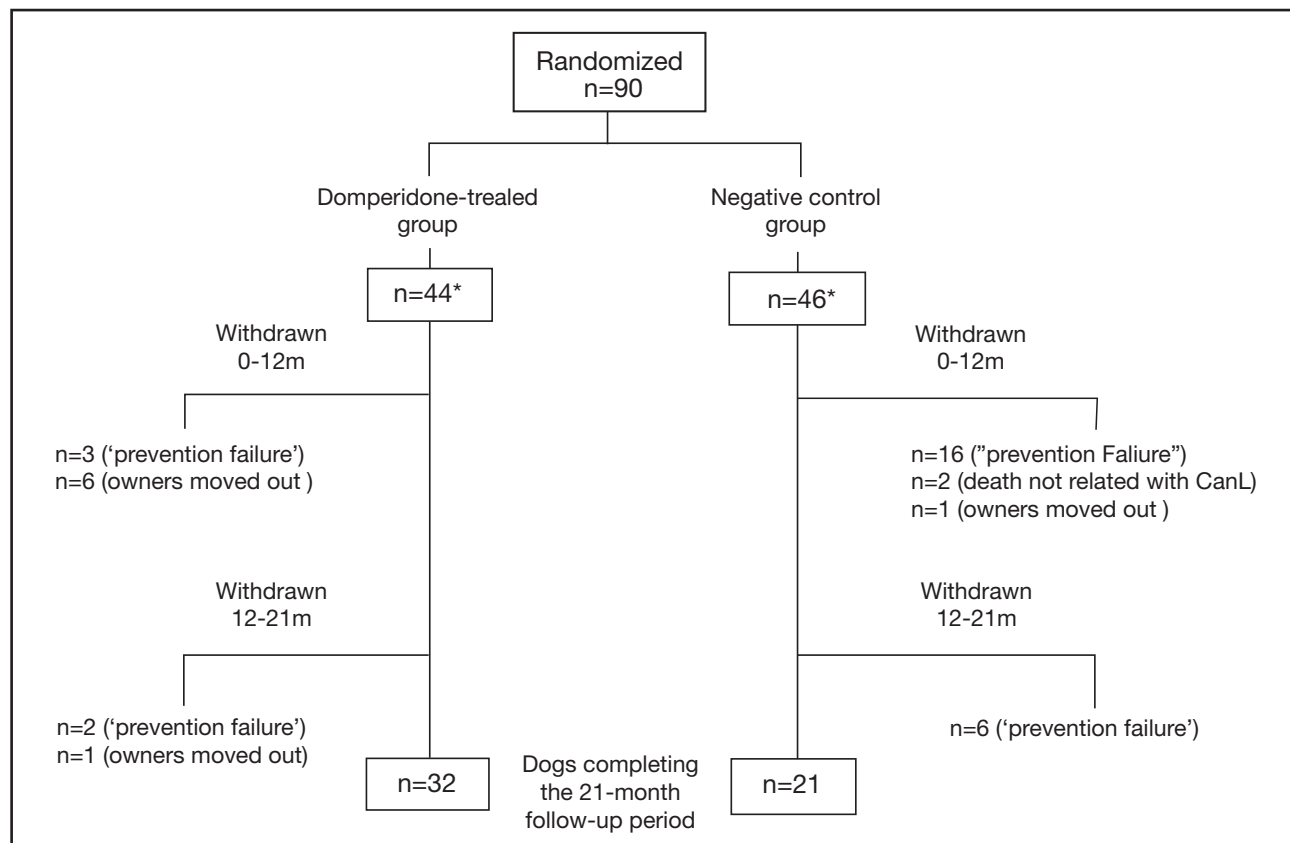


Fig. 1. Diagrama de flujo con el paso de los perros por un ensayo clínico para valorar la eficacia preventiva de una pauta de tratamiento basada en domperidona consistente en tratamientos de 30 días repetidos cada 4 meses con domperidona a 0,5 mg/kg pc/día frente a la leishmaniosis canina. *Perros cuyos datos se utilizaron para el análisis estadístico de las variables principal (número de perros retirados debido a 'fracaso de la prevención') al final del periodo de seguimiento de 21 meses) y secundaria (número de perros retirados debido a 'fracaso de la prevención' al final del periodo de seguimiento de 12 meses). Se utilizó el método de imputación de la última observación considerada al analizar los datos de todos los perros retirados durante el estudio.

Leyenda: Randomized = Aleatorizados – Withdrawn = Retirados – 'prevention failure' = 'fracaso de la prevención' – owners moved out = traslado de los propietarios – death not related with CanL = muerte no relacionada con Lcan – Dogs completing... = Perros que completaron el periodo de seguimiento de 21 meses

Tabla 1. Características basales de los perros asignados a los dos grupos de estudio y análisis de homogeneidad en un ensayo clínico para valorar la eficacia preventiva de una pauta de tratamiento basada en domperidona contra la leishmaniosis canina

	Grupo tratado con domperidona (n = 44)	Grupo de control negativo (n = 46)	Valor p
Sexo, n (%)			
Macho	25 (56,8%)	25 (54,3%)	
Hembra	19 (43,2%)	21 (45,7%)	0,981 ^a
Edad, años			
Media (DE)	5 (2,2)	5 (2,3)	
Rango	1 – 10	1 – 10	0,595 ^b
Peso corporal, kg			
Media (DE)	20,3 (10,83)	20,4 (8,46)	
Rango	6,5 – 54	7 – 43	0,683 ^b
Raza, n (%)			
Cruce	13 (29,5%)	23 (50,0%)	
Pastor alemán	4 (9,1%)	3 (6,5%)	
Pastor belga	1 (2,3%)	2 (4,3%)	
Golden Retriever	2 (4,5%)	1 (2,2%)	
Staffordshire inglés	4 (9,1%)	2 (4,3%)	
Labrador	1 (2,3%)	2 (4,3%)	
Bulldog inglés	1 (2,3%)	2 (4,3%)	
Bulldog francés	2 (4,5%)	2 (4,3%)	
Boxer	2 (4,5%)	1 (2,2%)	
San Bernardo	1 (2,3%)	0	
Dálmata	1 (2,3%)	0	
Schnauzer miniatura	1 (2,3%)	0	
Schnauzer gigante	1 (6,8%)	0	0,078 ^{a*}
Braco alemán	3 (2,3%)	1 (2,2%)	
Terrier Westinghouse	2 (4,5%)	0	
Pointer	1 (2,3%)	2 (4,3%)	
Carlin Pinscher	1 (2,3%)	0	
Cocker Spaniel	1 (2,3%)	0	
Spaniel del Rey Carlos	1 (2,3%)	0	
Shar Pei	1 (2,3%)	0	
Samoyedo	0	1 (2,2%)	
Perro de aguas español	0	1 (2,2%)	
Ratonero valenciano	0	1 (2,2%)	
Fox terrier	0	1 (2,2%)	
Airedale terrier	0	1 (2,2%)	
Condiciones de alojamiento, n (%)			
Exteriores	32 (72,7%)	8 (17,1%)	a
Interiores	12 (27,3%)	38 (82,6%)	<0,001

^a Prueba χ^2 de Pearson

^b Prueba t de Student

* Comparación realizada con los datos agrupados en dos clases (cruce frente a pura raza) para cumplir los requisitos de la prueba χ^2 de Pearson.

3.4 Valoración de la eficacia

Como muestra la **Fig. 2**, el porcentaje acumulado de casos de 'fracaso de la prevención' al cabo de 21 meses fue significativamente menor en el grupo tratado con domperidona que en el grupo de control negativo: 5 de 44 perros (11%) frente a 22 de 46 perros (48%), (prueba χ^2 de Pearson; $p < 0,001$). La diferencia siguió siendo estadísticamente signifi-

cativa tras ajustar el análisis a la única covariable no equilibrada (condiciones de alojamiento) (prueba de Mantel-Haenszel, $p=0,0009$). La tasa de prevención aportada por domperidona durante todo el periodo de seguimiento de 21 meses fue del 77%, con una razón de posibilidades [IC 95%] = 7,15 [2,4-21,4], $p < 0,001$. El tiempo hasta la retirada debida a 'fracaso de la prevención' fue significativamente más largo en el grupo tratado con domperidona que en el grupo de control negativo (prueba del orden logarítmico, $p=0,0003$); ver curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en la **Fig. 3**. La diferencia siguió siendo estadísticamente significativa tras ajustar el análisis a las condiciones de alojamiento mediante el modelo de regresión de Cox ($p=0,0023$).

El porcentaje acumulado de 'fracaso de la prevención' al cabo de 12 meses también fue significativamente menor en el grupo tratado con domperidona que en el grupo de control negativo: 3 de 44 perros (7%) frente a 16 de 46 perros (35%) (prueba χ^2 de Pearson; $p < 0,003$), y esta diferencia se mantuvo en el análisis ajustado a las condiciones de alojamiento (prueba de Mantel-Haenszel, $p=0,0008$). La tasa de prevención aportada por domperidona durante todo el periodo de seguimiento de 12 meses fue del 80%, con una razón de posibilidades [IC 95%] = 7,3 [1,9-27,3], $p < 0,001$.

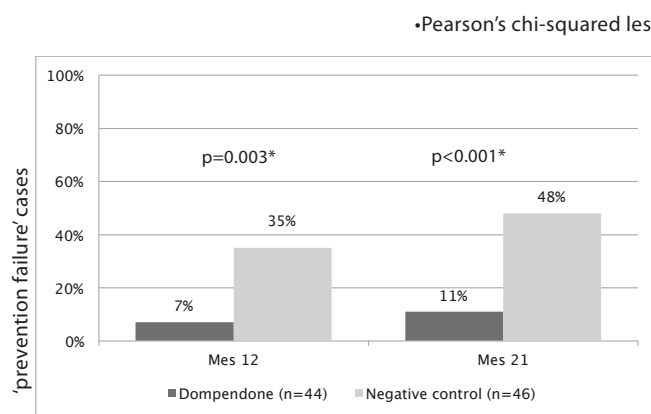


Fig. 2. Comparación de los porcentajes acumulados de perros con título de anticuerpos anti-*Leishmania* (IFAT) $\geq 1:80$ y al menos un signo clínico de leishmaniosis canina (casos de 'fracaso de la prevención') en los dos grupos del estudio, 12 y 21 meses después de su reclutamiento en un ensayo clínico para valorar la eficacia preventiva de una pauta de tratamiento basada en domperidona consistente en tratamientos de 30 días repetidos cada 4 meses con domperidona a 0,5 mg/kg pc/día frente a la leishmaniosis canina.

X = Mes 12 – Mes 21 Y = casos de 'fracaso de la prevención'

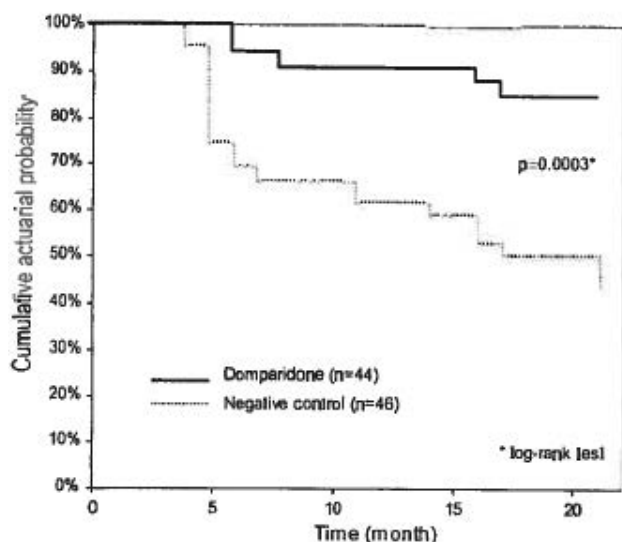


Fig. 3. Evolución (estimaciones de Kaplan-Meier) de la probabilidad acumulada de permanecer sano (seronegativo sin signos clínicos de leishmaniosis canina) en los dos grupos del estudio durante el periodo de seguimiento de 21 meses en un ensayo clínico para valorar la eficacia preventiva de una pauta de tratamiento basada en domperidona consistente en tratamientos de 30 días repetidos cada 4 meses con domperidona a 0,5 mg/kg pc/día frente a la leishmaniosis canina.

$X = \text{Tiempo (mes)}$ $Y = \text{Probabilidad actuarial acumulada}$

3.5. Efectos secundarios y aceptación del producto

Entre los perros tratados con domperidona, cuatro de 44 (9%) presentaron efectos secundarios atribuidos al producto. Concretamente, dos perros presentaron galactorrea leve 7 y 9 días después del inicio del tratamiento, que remitió al final del periodo de dosificación, y otros dos perros presentaron alteraciones gastrointestinales leves (heces blandas y diarrea, respectivamente), que remitieron tras reducir la dosis a la mitad durante unos días. No hubo que retirar a ninguno de estos animales del estudio. Finalmente, en base a los registros de tratamiento diario, la adherencia al tratamiento de los perros tratados con domperidona fue buena, con solo unos pocos perros que rechazaron el producto durante los primeros días de tratamiento. La pauta completa de tratamiento solo se interrumpió en los 12 perros del grupo tratado con domperidona que fueron retirados del estudio.

4. Discusión

La vacunación de perros contra Lcan se ha considerado tradicionalmente como la solución definitiva para prevenir el establecimiento de una infección activa y de la enfermedad clínica tras el contacto con el parásito causante (Reis y col., 2010; Miro y col., 2008; Solano-Gallego y col., 2011). Sin embargo, también se ha postulado que los agentes inmunomoduladores que estimulan los mecanismos de defensa del hospedador aumentando la producción endógena de citocinas son una herramienta potencialmente útil para la prevención y el tratamiento de enfermedades parasitarias (Masihi, 2000). En este estudio evaluamos la eficacia de una alternativa única al uso de vacunas para reducir el riesgo de desarrollar Lcan clínica, consistente en la administración de domperidona, un fármaco con actividad inmunomoduladora que ha demostrado previamente su eficacia en el tratamiento de perros seropositivos infectados naturalmente, particularmente en las fases iniciales de la enfermedad (Gómez-Ochoa y col., 2009).

Aunque se sabe que el control definitivo de Lcan depende principalmente del grupo de respuesta inmune adaptativa después de la primera semana de infección, también se ha descrito que la respuesta inmune innata que actúa inmediatamente después de la infección inicial tiene una función relevante en la protección contra la enfermedad (Bonilla-Escobar, 2005; Reis y col., 2010; Novais y col., 2009; Ribeiro-Gomes y Sacks, 2012). En estudios previos hemos demostrado que la administración oral de domperidona a perros sanos seronegativos ejerce un efecto estimulador transitorio sobre la respuesta inmune innata que aumenta de forma estadísticamente significativa el porcentaje de neutrófilos y macrófagos activados (Gómez-Ochoa y col., 2012). En ausencia de infección, el efecto estimulador de un tratamiento de 30 días con domperidona sobre las células fagocíticas polimorfonucleares solo es transitorio. Por consiguiente, en este estudio se consideró necesario repetir este tratamiento periódicamente durante la estación del vector para mantener al animal protegido de un eventual contacto con el parásito. Debido a la alta prevalencia de Lcan y a la larga estación del vector en la zona geográfica en que se realizó el estudio, se estableció estratégicamente que los tratamientos de 30 días con domperidona se repitieran cada 4 meses durante el periodo de seguimiento de 21 meses. El porcentaje acumulado de perros con títulos de anticuerpos $\geq 1:80$ más signos clínicos de Lcan obtenido en el grupo de control negativo al final del estudio confirma la alta presión de infección en la zona en que se realizó el estudio y recalca la validez de este grupo para controlar la eficacia de la domperidona.

En el reclutamiento de perros en el estudio no se utilizaron ensayos moleculares. Puesto que se sabe que los hallazgos positivos a PCR pueden anticipar la progresión de la enfermedad en perros mediante detección por serología y microscopía, puede suponerse razonablemente que algunos perros de ambos grupos ya estuvieran infectados en el momento del reclutamiento. A pesar de ello, cabe suponer que la inclusión de perros seronegativos potencialmente infectados fue similar en ambos grupos y que, por tanto, no afectó a las conclusiones generales del estudio.

Desgraciadamente, y a pesar de la asignación aleatoria de los perros a ambos grupos, las condiciones de alojamiento no estuvieron equilibradas. Concretamente, la proporción de perros que vivían principalmente al aire libre fue significativamente más elevada en el grupo tratado con domperidona, por lo que el riesgo de picadura por el flebotomo era teóricamente más elevado en este grupo. Aunque en el análisis estadístico de los datos se incluyó un ajuste de esta covariable, cabe destacar que los resultados obtenidos no fueron sustancialmente distintos de los obtenidos sin dicho ajuste. Por consiguiente, se confirmó que el impacto de este desequilibrio era irrelevante.

La pauta de tratamiento basado en domperidona de este estudio demostró una muy alta tasa de prevención, similar o incluso mejor que las tasas obtenidas con las vacunas contra Lcan actualmente disponibles. Así, el riesgo de que los perros tratados con domperidona desarrollaran enfermedad sintomática fue 7 veces menor que el de los perros no tratados, mientras que el riesgo notificado en perros vacunados con una de las vacunas recientemente aprobadas es unas 4 veces menor que en los controles, bajo condiciones de campo similares (EMA, 2012).

Por otra parte, en el conjunto de perros retirados del estudio debido a 'fracaso de la prevención', los animales tratados con domperidona presentaron títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* inferiores a los de los perros del grupo de control negativo. Ello concuerda con los resultados de estudios previos que demuestran que domperidona es eficaz para reducir el título de anticuerpos de animales enfermos en las fases iniciales de la enfermedad (Gómez-Ochoa y col., 2009). Por tanto, los resultados obtenidos también pueden indicar que, aunque no se haya demostrado específicamente, el tratamiento con domperidona ayuda a los perros ya infectados a controlar la progresión de la infección desde condiciones subpatentes.

Finalmente, la domperidona fue bien aceptada por los perros y los efectos secundarios relacionados con el fármaco fueron leves y poco frecuentes, lo cual confirma la seguridad de la pauta de tratamiento instaurada.

Como describe el apartado 3.1, durante el análisis de datos se utilizó el método de imputación de la última observación considerada, incluso en los perros retirados por motivos distintos a 'fracaso de la prevención'. Para comprobar si este método podía haber afectado a los resultados, se evaluó el 'peor escenario' (considerar a todos los animales retirados como 'fracaso de la prevención') volviendo a analizar las variables principal y secundaria con el nuevo método de imputación. Los resultados de estos análisis fueron similares a los obtenidos durante el análisis de datos principal, con diferencias estadísticamente significativas a favor del grupo tratado con domperidona tanto en la variable principal ($p=0,009$) como en la secundaria ($p=0,0327$).

En base a todo lo anterior, puede considerarse que la inmunomodulación periódica con domperidona es un abordaje seguro para reducir el riesgo de desarrollar Lcan clínica, con una eficacia com-

parable a la de las vacunas actualmente disponibles. Por tanto, al instaurarse junto con los compuestos repelentes, también sería eficaz como parte del abordaje integral propuesto por las directrices actuales para el futuro control de la Lcan (Paltrinieri y col., 2010; Solano-Gallego y col., 2011; Otranto y Dantas-Torres, 2013).

5. Conclusión

Los resultados de este estudio demuestran que la instauración de una pauta de tratamiento estratégica basada en domperidona consistente en tratamientos de 30 días repetidos cada 4 meses con domperidona a 0,5 mg/kg pc/día reduce el riesgo de desarrollar Lcan clínica en áreas con alta prevalencia de la enfermedad.

Declaración de conflicto de intereses

DS, JH y MS son empleados de ESTEVE, que financió este estudio.

ESTEVE

www.esteve.es

