



FIGURA 1. Áreas alopécicas correspondientes a lesiones granulomatosas no supurativas, típicas de leishmania cutánea. Foto: Rosa Tejada.

Artemisia annua **contra la leishmaniosis canina: cuatro casos clínicos**

Rosa Tejada Rascón

Centro Veterinario Perros y Gatos
Ciudad Real (España)

Dirección de contacto:

Rosa Tejada Rascón
C/ Toledo, 71
13003 Ciudad Real
cvperrosygatos@gmail.com

Resumen

La leishmaniosis canina es una enfermedad ampliamente extendida. En España afecta principalmente a la cuenca mediterránea, pero debido a su constante expansión, las zonas endémicas son cada vez mayores. La necesidad de controlarla hace que constantemente surjan nuevos tratamientos y protocolos terapéuticos. En ese sentido, la existencia de remedios naturales con probada efectividad terapéutica y carentes de efectos secundarios abre una puerta valiosa en el control y tratamiento de la enfermedad. *Artemisia annua* contiene artemisinina, una lactona sesquiterpénica que actúa induciendo estrés oxidativo en el parásito, inhibiendo su crecimiento e induciendo su apoptosis. Se presentan cuatro casos clínicos de leishmaniosis canina tratados con preparados de *A. annua* en los que se han obtenido mejorías significativas.

Palabras clave

Artemisia annua, artemisinina, leishmaniosis canina.

Artemisia annua contra a leishmaniose canina: quatro casos clínicos

Resumo

A leishmaniose é uma doença com ampla distribuição geográfica: em Espanha, afecta principalmente a bacia do Mediterrâneo mas, devido à sua constante expansão, as suas áreas endémicas são cada vez maiores. A necessidade de controlar esta doença leva a que surjam constantemente novos tratamentos e protocolos terapêuticos. Nesse sentido, a existência de fármacos naturais, com eficácia comprovada e desprovidos de efeitos secundários, abre uma porta inestimável para o controle e tratamento da doença. A planta medicinal *Artemisia annua* contém uma lactona sesquiterpénica, a artemisinina, que actua através da indução de stress oxidativo no parasita, inibindo o seu crescimento e induzindo a respectiva apoptose. Neste artigo são apresentados quatro casos de leishmaniose canina tratados com preparações de *A. annua* em que foram obtidas melhorias significativas.

Palavras chave

Artemisia annua, artemisinina, leishmaniose canina.

Artemisia annua against canine leishmaniasis: four clinical cases

Abstract

Canine leishmaniasis is a widespread disease: in Spain, it mainly affects the Mediterranean basin; but due to its constant expansion, the endemic areas are increasing. Due to the need of control, new treatments and therapeutic protocols constantly appear. In this context, the existence of natural remedies with proven therapeutic effectiveness and lacking side effects opens a valuable gateway in the control and treatment of the disease. *Artemisia annua* contains artemisinin, a sesquiterpene lactone which induces oxidative stress, inhibits the growth and induces the apoptosis in the parasite. Four clinical cases of canine leishmaniasis treated with *A. annua* preparations are presented. Significant improvements have been obtained.

Keywords

Artemisia annua, artemisinin, canine leishmaniasis.

Introducción

Las infecciones por protozoos son un problema de salud en todo el mundo, y la leishmania es una de las seis enfermedades infecciosas principales. La leishmaniosis canina es considerada actualmente una enfermedad endémica que afecta principalmente a la cuenca mediterránea, pero que está en constante expansión en otras zonas.

La leishmaniosis canina es una enfermedad causada por la multiplicación del protozoo flagelado de la especie *Leishmania infantum* en el sistema fagocitario mononuclear de los animales. Los principales vectores implicados en la transmisión de la enfermedad son *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*.

La característica más importante de la leishmaniosis canina es su extraordinario polimorfismo clínico. Por ello, una adecuada evaluación de la anamnesis y de la exploración física del animal es muy importante para confirmar la relación directa entre la infección por leishmania y la clínica que muestra el animal. Los signos clínicos que observamos son debidos principalmente a dos mecanismos patogénicos:

- Inflamación granulomatosa no supurativa en los lugares donde se multiplica el parásito. Se han descrito manifestaciones clínicas en piel, hígado, intestino, riñones, ojos, hueso y mucosas.

- Depósito de inmunocomplejos en distintas localizaciones anatómicas. Las lesiones producidas son principalmente renales, oculares y vasculares.

Una vez que el flebotomo inoculara la leishmania en la piel del perro, el parásito es fagocitado por los macrófagos dérmicos y desencadena una respuesta inmunitaria inflamatoria local de tipo innato, no específica. En la mayor parte de los perros la infección no acaba aquí y se extiende hasta los nódulos linfáticos regionales. Progresivamente se desencadena una respuesta inmune específica. Macrófagos y células dendríticas presentan los antígenos de leishmania y se activan clones de linfocitos Th1 específicos que producen, entre otras citoquinas, interferón gamma, un potente activador de los macrófagos vía producción de óxido nítrico.

En los casos en que existe una generalización de la infección, la respuesta inmune que predomina es de tipo humoral, resultado de la activación de clones de linfocitos T helper-2 (Th2) que conducen a la formación de inmunoglobulinas específicas. Estas inmunoglobulinas, principalmente Ig G e Ig M alcanzan niveles muy elevados no resultando protectoras, de forma que la infección progresa apareciendo lesiones y signos clínicos (FIGURAS 2 y 3).

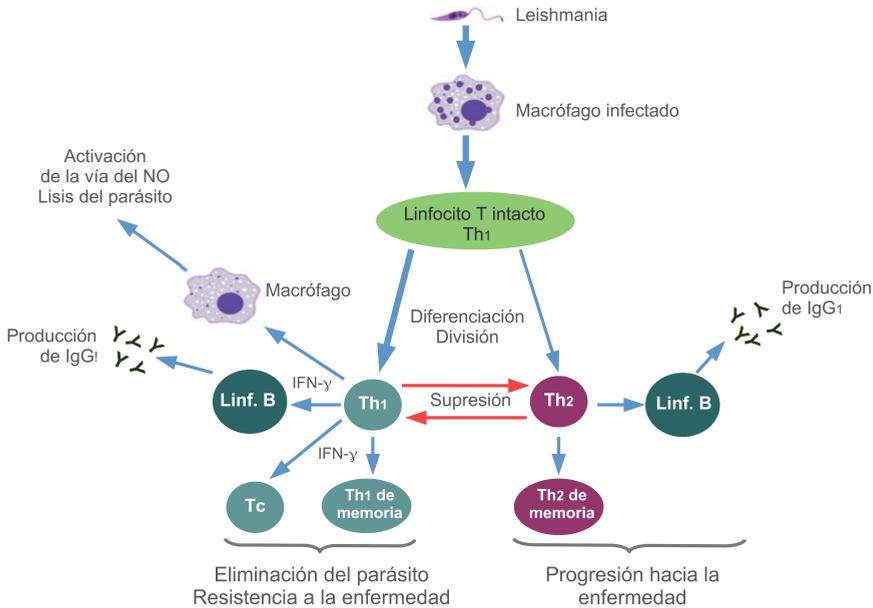


FIGURA 2. Progresión de la leishmaniosis en función de la respuesta inmune de las células. IFN-γ: Interferón gamma; Th: Linfocito T helper; IG: Inmunoglobulina; Linf. B: Linfocito B; NO: óxido nítrico. Ilustración (modificada) de Javier Moreno⁽⁸⁾.

La progresión de la leishmaniosis viene determinada por la deficiente respuesta inmune de las células, por lo que estimular dicha respuesta celular es fundamental en el control de la enfermedad. La *Artemisia annua* (FIGURA 4) ha demostrado actividad inmunopotenciadora junto con un efecto leishmanicida. Tanto la artemisinina (FIGURA 5) como las fracciones n-hexánicas extractos de hoja y semilla han mostrado una significativa actividad inhibitoria frente a los promastigotes de *Leishmania donovani* ($CI_{50} = 14,4$ y $14,6 \mu\text{g/mL}$ respectivamente) y frente a amastigotes intracelulares ($CI_{50} = 6,6$ y $5,05 \mu\text{g/mL}$)⁽¹⁻⁹⁾.

El tratamiento actual para esta enfermedad es largo, costoso y no evita que los animales tratados sufran recidivas en algún momento. Estos motivos hacen muy interesante buscar productos naturales, como las plantas medicinales, que contribuyan a mantener un mejor control de la enfermedad.

En este estudio, se pretende mostrar un tratamiento complementario que puede llegar a convertirse en una herramienta de gran ayuda por su fácil aplicación, por la buena aceptación en el paciente y por la falta de efectos secundarios, exceptuando a hembras gestantes durante el primer tercio de gestación. Dicho tratamiento se basa en el uso de la *Artemisia annua*, llamada popularmente artemisa dulce, ajénjo dulce o ajénjo chino, una planta perteneciente a la familia de las Asteráceas. La efectividad farmacológica de

la artemisinina, compuesto obtenido de sus partes aéreas, ha sido demostrada en pacientes humanos frente a la malaria. Además, su aceite esencial tiene actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

La autora no ha encontrado bibliografía específica sobre el empleo de la artemisa en el tratamiento de la leishmaniosis canina, aunque existen investigaciones con ratones y en humanos⁽¹⁻⁹⁾.

Para el estudio hemos empleado principalmente hoja seca molida o bien un extracto de hoja fresca de *A. annua*, se prepara por maceración de 500 g de hoja fresca en 1000 mL de etanol al 40% durante 15 días y posterior filtración. El líquido filtrado resultante (aproximadamente 400 mL) se concentra a la mitad de su volumen.

Objetivo del estudio

Pretendemos verificar el efecto positivo de la aplicación de la *Artemisia annua* en el tratamiento de la leishmaniosis canina, acelerando la recuperación clínica y la mejora de los parámetros analíticos en los animales con infección activa en diferentes estadios de la enfermedad. Por tanto, nos centraremos en los animales diagnosticados y que reciben este tratamiento, habiendo descartado otras patologías.

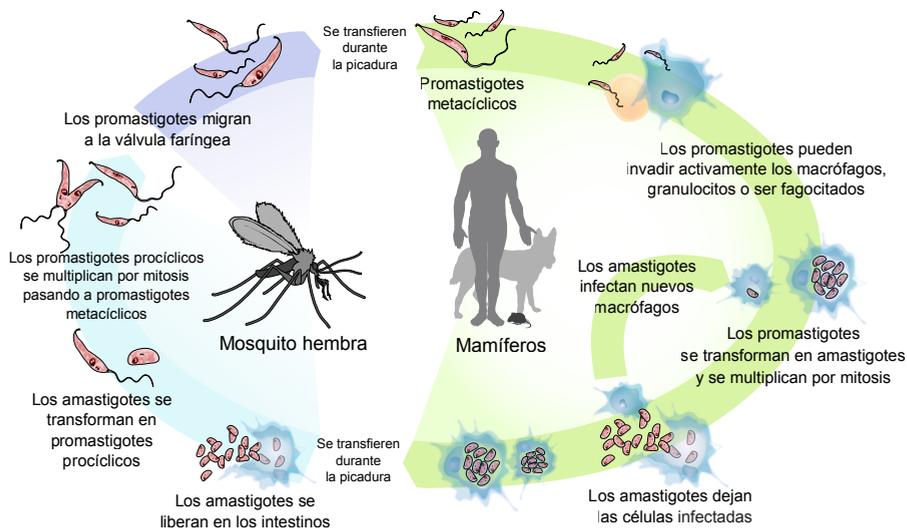


FIGURA 3. Ciclo vital de la leishmania. Autora de la ilustración: Ladyofhats (licencia CC).

Método de estudio

En este trabajo se presentan cuatro casos clínicos de leishmaniasis en perros que han sido tratados con preparados a base de *Artemisia annua* como tratamiento complementario o único en animales con diferentes estadios de la enfermedad. En algunos casos se administraron otros tratamientos convencionales, pero en ningún caso los fármacos leishmanicidas habituales.

El protocolo habitual para un animal que se presenta con indicios de padecer leishmaniasis, se basa en un análisis completo que incluye hemograma, bioquímica general y proteinograma. El diagnóstico se verifica mediante serología IFI, ELISA o ambos.

A todos los animales se les administró 1 g/10 kg de extracto o de polvo de hoja seca dos veces al día, fuera del horario de comidas en tandas de 9 días seguidas de intervalos de descanso de 7 días.

Una vez comenzado el protocolo terapéutico se hizo el seguimiento del animal al mes y a los tres meses (TABLA 1). Para ello, se realizó analítica completa y proteinograma. En determinados casos se llevó a cabo una punción ecoguiada de bazo para realizar PCR cuantitativa.

Casos clínicos

Caso 1

Lucas es un mestizo, macho no castrado, de 3,9 kilos y una edad de 7 años. Llega a la clínica con una lesión en la lengua compatible con chancro por leishmania. Su dueño nos comenta que apreció la lesión hace un mes. Además, la exploración realizada reveló alopecia orbicular bilateral y carencia de brillo en el pelo, junto con seborrea e hipertrofia de los ganglios poplíteos. Pese a todo su estado general era bueno.

Las pruebas de laboratorio que se aplicaron para la detección de alteraciones clínico-patológicas confirmaron la existencia de leishmania.

Comenzamos con domperidona (0,5 mg/Kg/24 h durante 28 días) y artemisa (1 g/10 Kg cada 12 h, según el protocolo descrito anteriormente). A los 15 días, el dueño refiere que encuentra a su mascota mejor, su piel y pelo han mejorado. No fue posible hacer control mensual del tratamiento, por lo que se pautó hacerlo a los tres meses.

La mejoría clínica de Lucas tras el tratamiento es evidente y, en cuanto a los resultados analíticos, es importante comentar que en la primera extracción no fue posible determinar algunos parámetros, ya que la muestra presentaba

Parámetro	Caso 1 (Pre/post tratamiento)	Caso 2 (Pre/post tratamiento)	Caso 3 (Pre/post tratamiento)	Caso 4 (Pre/post tratamiento)	Valores de referencia
Hemograma					
Serie roja					
Hematíes	8,96/8,38 x 10 ⁶	9,33/9,21 x 10 ⁶	7,14/8,29 x 10 ⁶	7,96/10,74 x 10 ⁶	5,6-8,5 x 10 ⁶
Hematocrito	58,6%/57,4%	57,4/57,05%	49,1/46,5%	49,5/68,26%	38,7-57%
Hemoglobina	20,3/18,5	20,5/20,3	17,2/19,7	17,5/23,5	13,4-19,1 g/dL
Reticulocitos	7.952/69.554	59.712/89.337	47.124/68.807	85.968	10.000-110.000 cels/μL
Serie blanca					
Leucocitos	8.180/6.850	5.740/5.660	7.390/5.480	7.470/10.180	5.950-17.200
L. Cayados	49/0,1	29/11	37/44	22	0-500 cels/μL
L. Segmentados	4.924/4.096	3.168/2.960	4.767/2.713	3.630	3.380-11.530 cels/μL
Linfocitos	2.364/1.719	2.221/1.970	879/1.748	3.145	900-4.300 cels/μL
Monocitos	327/747	321/408	503/411	202	100-1.700 cels/μL
Eosinófilos	507/281	0/311	22/553	463	100-1.250 cels/μL
Plaquetas	180.000/187.000	190.000/222.000	416.000/359.000	208.000	145.000-493.000
Bioquímica					
Proteínas	7,8/7,4	6,6/5,8	7,6/6,7	6,2/6,5	4,8-7,8 g/dL
GPT (ALT)	Hemolizada/168 ^a	63/74	29/31	42/30	26-89 UI/L
GOT (AST)	Hemolizada/44	37/41	43/33	24/49	16-89 UI/L
Creatinina	0,8/0,7	0,9/1,0	1,2/1,2	1,0/1,4	0,5-1,5 mg/dL
SDMA	10/8	7/12		11/11	0-14 μg/dL
Fosfatasa alcalina	Hemolizada	85/69	63/77	23/24	13-105 UI/L
Glucosa	95/83				60-120 mg/dL
Urea	42/43	48/38	32/28	44/33	21-59 mg/dL
Proteinograma					
Proteínas totales	7,8/7,4	6,6/5,8	6,6/5,8	6,2/6,5	5,2-7,6 g/dL
Albumina	3,3/3,0	3,0/3,1	3,0/3,1	3,5/3,2	2,87-4,76 g/dL
Globulinas totales	4,6/4,4	3,7/2,6	3,7/2,6	2,7/3,3	2,06-5,06 g/dL
Alfa-1-globulinas	0,2/0,2	0,2/0,1	0,2/0,1	0,2/0,3	0,15-0,42 g/dL
Alfa-2-globulinas	1,0/0,9	1,0/0,6	1,0/0,6	0,6/0,8	0,44-1,21 g/dL
Beta-globulinas	1,3/1,3	1,6/1,2	1,6/1,2	1,1/1,2	0,72-1,80 g/dL
Gamma-globulinas	2,1/2,0	0,9/0,7	0,9/0,7	0,8/1,0	0,28-1,57 g/dL
Cociente A/G	0,7/0,7	0,8/1,2	0,8/1,2	1,3/1,0	
Serología					
Ac. anti-leishmania	1/1280 / -	1/1280 / -	1/80 / Negativo	1/640 / 1/640	
Ratio leishmania	3,51	3,5/-	1,21/0,52	3,05/3,2	< 0,6
Biología molecular (PCR)					
<i>Leishmania</i> spp. DNA		52.954/12	- / 0	900/0	Parásitos/ml de punción

TABLA 1. Variación de los parámetros analíticos con el tratamiento con *Artemisia annua*. SDMA: Dimetilarginina simétrica.

^a En la primera extracción no fue posible determinar algunos parámetros, ya que la muestra presentaba hemólisis; por tanto no hay referencia para contrastar con los resultados obtenidos a los tres meses de tratamiento. La medición de GPT (Alanina aminotransferasa) a los tres meses fue de 168 UI/L, valor muy por encima de los valores de referencia. Debido a no tener un valor de referencia inicial se optó por volver a medir la GPT al mes de la obtención de éste con un resultado fue de 89,6 UI/L que demuestra la falta de hepatotoxicidad de la *Artemisia annua*.



FIGURA 4. *Artemisia annua*. Foto: B. Vanaclocha.

hemólisis; por tanto no hay referencia para contrastar con los resultados obtenidos a los tres meses de tratamiento. La medición de GPT (ALT, alanina aminotransferasa) fue de 168 UI/L, valor muy por encima de los valores de referencia, por lo que se analizó nuevamente pasado un mes, sin interrumpir el tratamiento pautado. En este momento el valor fue de 89,6 UI/L. De forma que podemos concluir que la *Artemisia annua* no sólo no es hepatotóxica, sino que hay evidencia clara de una mejoría analítica.

Caso 2

Greta es una hembra de raza Borzoi, castrada, y 27 kg de peso. Fue diagnosticada de leishmania tres años antes y se le aplicaron diferentes tratamientos (alopurinol y mitelofosina; autovacuna, repetida en dos ocasiones, metilglucamina antimoniat), con respuesta analítica satisfactoria y mejoría clínica que en realidad no era duradera pues el paciente recaía continuamente, hecho que llevaba a modificar los tratamientos. En diciembre de 2015 se introdujo en el protocolo artemisa y actualmente no ha habido recaídas.

Por su parte, los controles analíticos siguieron el protocolo básico, incluyendo hemograma, bioquímica general, proteínograma y PCR por aspirado ecoguiado en bazo.

Dado que fue un tratamiento prolongado a lo largo de tres años y los resultados son variables en función al tratamiento administrado, la autora no considera necesario presentarlos aquí. No obstante, sí que hay unos resultados que merecen ser subrayados. Concretamente, los relativos a la PCR por aspiración en bazo:

- Biología molecular hecha en febrero 2015: 52.954 parásitos/mL punción

- Biología molecular hecha en febrero de 2016, tras tomar artemisia durante tres meses: 12 parásitos/mL punción.

En diciembre de 2015, se mantenía con alopurinol pero se produjo un empeoramiento clínico y se optó por introducir artemisia, en este caso como monoterapia. La respuesta fue muy buena y dos meses después el estado general es muy favorable.

Al tratarse de un animal con tratamientos anteriores frente a leishmania, incluyendo leishmanicidas, y con constantes recaídas, podemos concluir que la *A. annua*, como monoterapia ha resultado muy favorable, con resultados clínicos y analíticos satisfactorios.

Caso 3

Taco es un Teckel de 4 años de edad. Se presenta en consulta con lesiones papulo-costrosas en el puente nasal y pioderma bacteriana superficial. Debido a la alta incidencia de leishmania en la zona, y teniendo en cuenta que el patrón de lesiones es sugerente de la misma, se decide realizar analítica completa incluyendo prueba para confirmar la existencia de la misma.

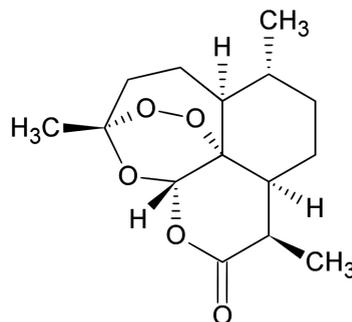


FIGURA 5. Estructura química de la artemisinina.



FIGURA 6. Cultivo de *Artemisia annua*. Foto: Jorge Ferreira (licencia CC).

Tras un mes de tratamiento (*Artemisia annua* como monoterapia a dosis 1g/10 kg), hay evidente mejoría clínica y analítica. No ha habido recaídas hasta el momento.

Caso 4

Abu es un macho, mestizo de 4 años. Presenta lesiones alopecicas que evidencian la existencia de sarna demodéica. Debido a que esta patología es habitual en animales con estado inmunitario comprometido, se decide hacer exploración general comprobando un aumento considerable de los ganglios poplíteos, signo muy habitual en la leishmaniosis canina, por lo que se procedió a realizar analítica completa incluyendo determinación de leishmania con resultado positivo.

En este caso se ha usado *A. annua* como monoterapia para la leishmania combinado con tratamiento para sarna demodéica.

Tras varios meses de tratamiento la evolución de Abu fue muy buena tanto clínica como analíticamente.

Conclusiones

La autora considera que estos datos demuestran que el tratamiento alternativo con *A. annua* es muy beneficioso, pues los animales han mostrado mejorías significativas en las distintas evaluaciones clínicas, así como en las correspondientes pruebas de laboratorio. Igualmente, los propietarios han referido la buena recuperación en casa de sus mascotas, así como la facilidad de aplicación del tratamiento. Por otro lado, dicho tratamiento puede llegar a prolongarse durante años en alguno de los casos descritos, ya que en ninguno de ellos se observan alteraciones analíticas ni recaídas.

En uno de los casos puede comprobarse que el mismo animal habiendo sido tratado con diferentes fármacos leishmanicidas, presentaba recaídas constantes, y tras administrar artemisa hay una notable mejoría clínica y analítica que se mantiene hasta el momento.

A pesar de los pocos casos expuestos, son evidentes los resultados en cada uno de ellos, por lo que se puede considerar que la aplicación de la *A. annua* en el tratamiento de la leishmaniosis canina resulta positiva para la recuperación del animal.

Referencias bibliográficas

- Boareto AC, Muller JC, Bufalo AC, Botelho GG, de Araujo SL, Foglio MA, et.al. Toxicity of artemisinin [*Artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in Wistar rats. *Reproductive toxicology* 2008; 25 (2): 239-46.
- Su XZ, Miller LH. The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science China. Life Sciences* 2015; 58 (11): 1175-9.
- Islamuddin M, Chouhan G, Tyagi M, Abdin MZ, Sahal D, Afrin F. Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against visceral leishmaniasis. *Front Microbiol.* 2014 Nov 25;5:626. doi: 10.3389/fmicb.2014.00626. Erratum in: *Front Microbiol.* 2015;6:1015.
- Loo CS, Lam NS, Yu D, Su XZ, Lu F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. *Pharmacol Res.* 2016; 117: 192-217. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.012.
- Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, Afrin F. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9 (1): e3321. doi: 10.1371/journal.pntd.0003321.
- Islamuddin M, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, Afrin F. Extracts of *Artemisia annua* leaves and seeds mediate programmed cell death in *Leishmania donovani*. *J Med Microbiol;* 61 (Pt 12): 1709-18. doi: 10.1099/jmm.0.049387-0.
- Malebo HM, Tanja W, Cai M, Swaleh SA, Omolo MO, Hassanali A, Séquin U, Hamburger M, Brun R, Ndiege IO. Antiplasmodial, anti-trypansomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. *Tanzan J Health Res.* 2009; 11 (4): 226-34.
- Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol.* 2007; 56 (Pt 9): 1213-8.
- Moreno J. CaniLeish, una vacuna para la leishmaniosis canina basada en evidencias científicas. *Argos Portal Veterinaria*, 19/2/2016. Disponible en: http://argos.portalveterinaria.com/fotos/editor/12301/ar0816_virbac_caniLeish_vacuna_probada_esquema.jpg.