



FIGURA 1. *Artemisia annua*.  
Foto: B. Vanaclocha.

Rosa Tejada Rascón<sup>a</sup>

Virginia Iniesta Orozco<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Clínica Veterinaria Perros y Gatos,  
Ciudad Real.

<sup>b</sup> Unidad de Parasitología y  
Enfermedades Parasitarias. Facultad  
de Veterinaria, Universidad de  
Extremadura, Cáceres

**Dirección de contacto:**

Rosa Tejada Rascón

Clínica Veterinaria Perros y Gatos.  
C/ Toledo, 71, 13003 Ciudad Real.  
cvperrosygatos@gmail.com

# Evaluación de la eficacia de un extracto de *Artemisia annua* en leishmaniosis canina

## Resumen

En el presente trabajo se muestran los resultados de un estudio experimental, multicéntrico, no controlado, en el que se ha comprobado la eficacia y seguridad de un extracto seco de *Artemisia annua* en perros con leishmaniosis.

En el estudio participaron 34 perros, que recibieron una dosis media de un extracto seco de *Artemisia annua* equivalente a 100 mg/kg/12 h de hoja seca, en tandas de 9 días seguidos de descanso de 7 días durante tres meses. 24 de los perros fueron tratados únicamente con el extracto de *A. annua*, los 10 restantes habían sido tratados con medicación convencional y tras sufrir recaídas se les administró el extracto, sin interrumpir el tratamiento con alopurinol (10 mg/kg/12 h). Los animales fueron analizados al principio del tratamiento y a los tres meses mediante evaluación de los signos clínicos asociados a la enfermedad, análisis de sangre y orina (en los casos que lo requerían), y título de anticuerpos (frente a *Leishmania infantum* por inmunofluorescencia indirecta). En 24 de ellos, además, se midió la respuesta inmune mediante ELISA y la carga parasitaria a través del método qPCR.

En todos los casos se observó una mejora clínica evidente y una disminución de la carga parasitaria, sin apreciarse diferencias significativas entre los casos tratados sólo con el extracto y aquellos que recibieron además alopurinol, excepto una normalización más precoz en el título de anticuerpos en los animales suplementados con alopurinol.

La administración del extracto no provocó efectos adversos en ninguno de los animales.

En base a los resultados obtenidos *A. annua* podría postularse como una alternativa terapéutica en leishmaniosis canina.

## Palabras clave

*Artemisia annua*, leishmaniosis canina, *Leishmania infantum*, alopurinol, anticuerpos, carga parasitaria, qPCR.

## Avaliação da eficácia de um extrato de *Artemisia annua* na leishmaniose canina

### Resumo

O presente trabalho mostra os resultados de um estudo experimental, multicêntrico e não controlado no qual foi verificado a eficácia e segurança de um extrato seco de *Artemisia annua* em cães com leishmaniose.

Trinta e quatro cães participaram do estudo e receberam, por três meses, dose média de extrato seco de *Artemisia annua* equivalente a 100 mg/kg/12 h de folha seca, em lotes de 9 dias, seguidos de 7 dias de repouso. Vinte e quatro dos cães foram tratados apenas com o extrato de *A. annua*, enquanto os 10 restantes, que estavam sendo tratados com alopurinol (10 mg / kg / 12 h), receberam adicionalmente o extrato após sofrer recaídas. Os animais foram analisados no início do tratamento e aos três meses pela avaliação dos sinais clínicos associados à doença, exames de sangue e urina (nos casos que exigiam), bem como título de anticorpos (contra *Leishmania infantum* por imunofluorescência indireta ) Em 24 deles, além disso, a resposta imune foi medida por ELISA e a carga parasitária pelo método qPCR.

Em todos os casos foi observada melhora clínica evidente e diminuição da carga parasitária, não havendo diferenças significativas entre os casos tratados apenas com o extrato e os que também receberam alopurinol, exceto por uma normalização mais precoce do título de anticorpos nestes últimos.

A administração do extrato não causou efeitos adversos em nenhum dos animais.

Com base nos resultados obtidos, o extracto de *A. annua* pode ser postulada como alternativa terapêutica na leishmaniose canina.

### Palavras chave

*Artemisia annua*, Leishmaniose canina, *Leishmania infantum*, alopurinol, anticorpos, carga parasitária, qPCR.

## Evaluation of the efficacy of an extract of *Artemisia annua* in canine leishmaniasis

### Abstract

The present work shows the results of an experimental, multicenter, not controlled study in which it has been verified the efficacy and safety of a dry extract of *Artemisia annua* against leishmaniasis in dogs.

Thirty-four dogs participated in the study and received, along three months, a mean dose of *Artemisia annua* dry extract equivalent to 100 mg/kg/12 h of dry leaf, alternating periods of 9 days of treatment and 7 days of pause. Twenty-four dogs were treated only with the *A. annua* extract, while the remaining 10, which were being treated with allopurinol (10 mg/kg/12 h), were additionally administered with the extract after suffering relapses. The animals were analyzed at the beginning of the treatment and at three months by evaluation of the clinical signs associated with the disease, blood and urine analysis (when required), as well as titration of antibodies against *Leishmania infantum* by indirect immunofluorescence. In 24 of them, immune response by ELISA and parasitic load by qPCR were additionally measured.

In all cases, a clinical improvement and a decrease in the parasite load were evidenced, with no significant differences between the cases treated with the extract alone and those that also received allopurinol, except for an earlier normalization of the antibody titer in the latter.

The administration of the extract did not cause adverse effects in any of the animals.

Based on the results obtained, *A. annua* extract could be postulated as a therapeutic alternative in canine leishmaniasis.

### Keywords

*Artemisia annua*, canine leishmaniasis, *Leishmania infantum*, allopurinol, antibodies, parasitic load, qPCR.

## Introducción

La leishmaniosis canina es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal producida por protozoos del género *Leishmania*. Se considera una zoonosis global, presente en regiones del sur de Europa, África, Asia, América del Sur, América Central y también se ha informado de casos en los Estados Unidos de América, afectando hasta un total de 98 países. En Europa afecta, de forma endémica, principalmente a los países de la cuenca mediterránea. En España, la leishmaniosis canina es una enfermedad originada por *L. infantum*, especie causante de leishmaniosis visceral, capaz de infectar a animales y a seres humanos (FIGURA 2).

El vector responsable de su transmisión es un díptero del género *Phlebotomus*, conocido vulgarmente como flebotomo o mosca de la arena, siendo *P. ariasi* y *P. perniciosus* las especies involucradas en la transmisión en nuestro país.

La infección por *L. infantum* puede resultar insidiosa y crónica, sin embargo, no en todos los casos es sinónimo de enfermedad clínica. Por otra parte, existe una elevada prevalencia de infección subclínica, y enfermedades concomitantes o estados de inmunosupresión pueden desencadenar la progresión y desarrollo de la enfermedad clínica. Por este motivo, el diagnóstico y tratamiento precoces,

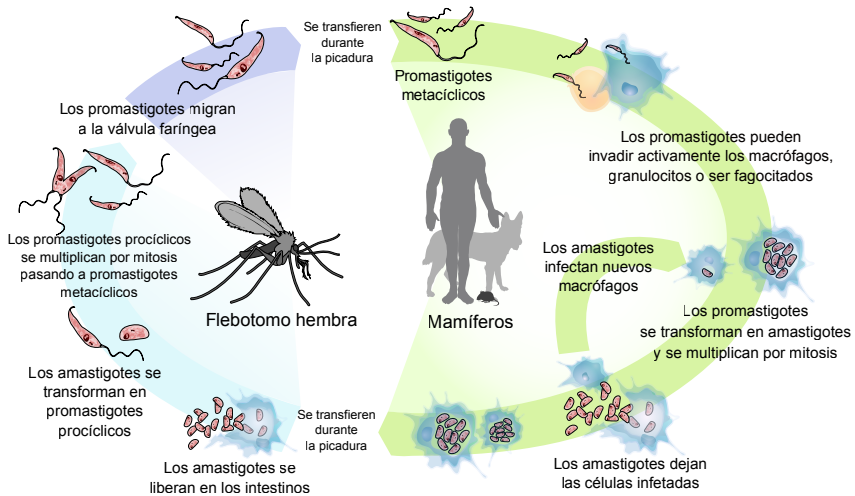


FIGURA 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Adaptado de Ladyofhats (licencia CC).

y sobre todo la prevención con repelentes probados frente a flebotomos, son fundamentales para su control.

Los signos clínicos asociados a la leishmaniosis canina son múltiples, pudiendo afectar a cualquier órgano, tejido e incluso líquidos corporales. Las manifestaciones más frecuentes son de tipo cutáneo, con aparición de zonas alopécicas locales o generales, dermatitis exfoliativa o ulcerativa. También pueden aparecer signos generales como vómitos, anorexia, pérdida de peso, esplenomegalia o linfadenopatías, acompañados de alteraciones analíticas como hipoalbuminemia, hipergammaglobulinemia, anemia, leucocitosis o leucopenia, entre otras.

Debido a la variabilidad de signos y síntomas y al amplio rango de anormalidades analíticas, el diagnóstico diferencial es complejo. De esta forma, es fundamental realizar una buena exploración física del animal, acompañada de analítica sanguínea completa y de pruebas de laboratorio para la detección de *Leishmania* mediante métodos tanto inmunológicos como parasitológicos o moleculares que permitan determinar si se trata de un perro enfermo o solo infectado<sup>(1)</sup>.

El tratamiento convencional se basa en el empleo de fármacos con acción leishmanicida (miltefosina y/o sales antimoniales), y leishmanioestática (alopurinol); sin embargo, la aparición de efectos adversos, recaídas o intolerancia al tratamiento hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas para el control de esta enfermedad tan devastadora.

*Artemisia annua* L., llamada popularmente ajenojo dulce o ajenojo chino, es una planta medicinal perteneciente a la familia de las Asteráceas. Entre sus diferentes principios activos destaca la artemisinina (lactona sesquiterpénica, presente en mayor proporción en la parte aérea de la planta), con acción demostrada en pacientes humanos frente a la malaria. Cabe destacar que la hoja desecada de *A. annua* fue eficaz en casos resistentes al tratamiento con terapias combinadas basadas en artemisinina y artesunato i.v. Probablemente, los flavonoides y otros constituyentes de la droga potencian la eficacia de la artemisinina<sup>(2)</sup>. Tanto la artemisinina como las fracciones n-hexánicas de hoja y semilla de *A. annua* han mostrado una significativa actividad inhibitoria tanto de los promastigotes como de los amastigotes intracelulares de *Leishmania donovani*<sup>(3-5)</sup>.

### Objetivo del estudio

El objetivo de este ensayo ha sido comprobar la eficacia de un extracto seco de hoja de *A. annua* en perros con leishmaniosis en diferentes etapas de la enfermedad, así como su seguridad y la evaluación del beneficio/riesgo de su administración.

### Material y métodos

#### Descripción de los animales de estudio

Se realizó un estudio experimental, multicéntrico no controlado con 34 perros de ambos sexos (18 hembras y 16 machos) y distintas razas, procedentes de 6 zonas geográficas de España y con un rango de edad comprendido entre

los 6 meses y los 13 años. Los perros, diagnosticados de leishmaniosis mediante un análisis serológico por IFI llevado a cabo en el mismo laboratorio externo (IDEXX laboratorios), fueron clasificados en cuatro grupos (en función de los estadios de la enfermedad establecidos en la Guía

Leishvet <sup>(1)</sup> conforme a sus signos clínicos, alteraciones analíticas y título de anticuerpos (TABLA 1).

La identificación, procedencia, características y tratamiento recibido de cada uno de los animales del ensayo se muestran en la TABLA 2.

TABLA 1. Distribución de los de animales del estudio según el grado de la enfermedad y las características analíticas y clínicas de cada grupo.

Grupo	Nº	Características
I (Leve)	7	Título de anticuerpos bajo. Escasos signos clínicos. Sin alteraciones analíticas.
II (Moderada)	20	Título de anticuerpos bajo o alto. Presencia de signos clínicos (principalmente cutáneos). Algunas alteraciones analíticas asociadas (hipoalbuminemia, anemia no regenerativa, hipergammaglobulinemia). Exentos de daño renal y proteinuria.
III (Grave)	5	Título de anticuerpos alto. Signos descritos las etapas anteriores, además de lesiones asociadas a depósitos de inmunocomplejos (vasculitis, artritis, uveítis y glomerulonefritis) Alteraciones analíticas incluidas en etapa moderada, acompañadas de enfermedad renal crónica con proteinuria moderada.
IV (Muy grave)	2	Características de los incluidos en el grupo III, además de síndrome nefrótico con proteinuria grave

TABLA 2. Descripción de los animales incluidos en el estudio. Se especifica el grado de la enfermedad, tipo de tratamiento, procedencia, raza y sexo de los 34 perros incluidos en los 4 grupos del estudio.

Grupo	Tratamiento	Referencia *	Procedencia	Edad (años)	Raza	Sexo	Total animales
I	AA	1	Ciudad Real	4	Mestizo	H	7
		2	Ciudad Real	3	Mestizo	H	
		3	Ciudad Real	9	Mestizo	H	
		6	Ciudad Real	6	Mestizo	M	
		9	Ciudad Real	8	Mestizo	H	
		20	Pontevedra	9	Mestizo	M	
		27	Pontevedra	5	Mestizo	H	

Grupo	Tratamiento	Referencia *	Procedencia	Edad (años)	Raza	Sexo	Total animales
II	AA	5	Ciudad Real	2	Bodeguero	H	13
		7	Ciudad Real	7	Mestizo	M	
		10	Valladolid	2	Mestizo	M	
		11	Ciudad Real	10	Cocker	M	
		12	Pontevedra	6	Chihuahua	M	
		13	Madrid	6	Bulldog francés	H	
		15	Madrid	6	Golden retriever	H	
		16	Madrid	4	Galgo	H	
		17	Pontevedra	12	Mestizo	M	
		4	Ciudad Real	5	Boxer	M	
		28	Ciudad Real	3	Labrador	H	
		30	Madrid	5	Mestizo	M	
		31	Pontevedra	1	Bulldog francés	M	
		II	AA+AI	8	Ciudad Real	12	
19	Pontevedra			13	Cruce Sharpei	H	
23	Pontevedra			9	Schnauzer mini	M	
24	Pontevedra			2	Labrador	H	
32	Valencia			0,5	Rottweiler	M	
33	Valencia			4	Mestizo	M	
34	Pontevedra			10	Mestizo	H	
III	AA	25	Ciudad Real	8	Labrador	M	3
		18	Pontevedra	7	Cruce pastor alemán	H	
		14	Ciudad Real	12	Setter inglés	H	
	AA+AI	21	Pontevedra	8	Terranova	M	2
		22	Pontevedra	5	Mestizo	M	
IV	AA	29	Málaga	6	Pastor alemán	H	1
	AA+AI	26	Pontevedra	6	Pastor alemán	H	1

\* La referencia numérica de los animales viene determinada por su orden de entrada en el ensayo. AA: extracto de *A. annua*, AI: alopurinol.

### Protocolo de administración de *Artemisia annua*

El protocolo de administración del tratamiento fue el mismo en todos los perros, independientemente del estadio de la enfermedad en el que estos se encontrasen.

El tratamiento consistió en un extracto seco 30:1 (disolvente no especificado) de *A. annua*, en dosis equivalentes a 100-500 mg de hoja seca por Kg de peso, 2 veces al día, al menos 2 horas antes o después de las comidas, en tandas de 9 días seguidos de descanso de 7 días durante tres meses. La mayoría de los animales siguieron el tratamiento y el control analítico hasta un año.

Se estimó una dosis media equivalente a 100 mg/kg/12h de droga vegetal. Debido a la dificultad para dosificar correctamente a animales con un peso inferior a 20 kg, los perros 12, 17 y 23 recibieron dosis superiores, llegando a administrar el equivalente a 500 mg/kg/12 h.

De los 34 perros incluidos en el ensayo (TABLA 2), 24 de ellos fueron tratados únicamente con el extracto de *A. annua*; los 10 restantes habían sido tratados con medicación convencional y tras sufrir recaídas se les administró el extracto, sin interrumpir el tratamiento con alopurinol pautado por su veterinario (10 mg/kg/12 h) hasta pasados 6 meses; después continuaron el tratamiento únicamente con el extracto.

### Parámetros empleados en la monitorización de la enfermedad

Para medir la eficacia del producto se evaluó la progresión de la enfermedad y el estado inmunitario de los animales tanto al inicio del tratamiento ( $T_0$ ) como a los 3 meses ( $T_{90}$ ), analizando los siguientes parámetros:

- Signos clínicos (TABLA 3).
- Hemograma (TABLA 4).
- Bioquímica sérica (TABLA 4): proteinemia (proteínas totales, albúmina, globulinas), perfil renal (urea, creatinina, UPC) y perfil hepático (GPT y fosfatasa alcalina).
- Proteinograma (TABLA 5).
- Urianálisis para valorar la presencia de proteinuria (TABLA 5).
- Título de anticuerpos (frente a *Leishmania* mediante inmunofluorescencia indirecta, IFI) (TABLA 6).

Además, a los primeros 24 animales incluidos en el ensayo (identificados con los números 1 a 24) se realizaron pruebas adicionales (TABLA 6), llevadas a cabo por el Laboratorio LeishmanCeres (Facultad de Veterinaria de Cáceres),

entidad con certificado de cumplimiento de Buenas Prácticas de Laboratorio por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). A los 10 animales restantes no se les pudieron realizar estos análisis por su elevado coste, debido a la falta de financiación. Los análisis adicionales realizados a estos 24 animales fueron los siguientes:

- Análisis inmunológico para determinación de anticuerpos (en sangre mediante la técnica inmunoenzimática ELISA<sup>(6)</sup> frente a antígeno total soluble (SLA) y frente a la proteína recombinante PR de *Leishmania infantum*.
- Análisis molecular para la cuantificación de la carga parasitaria mediante el método de PCR a tiempo real (qPCR) en muestras de sangre, pelo e hisopado (de cerumen, conjuntival o de lesión dérmica, según la manifestación clínica de cada animal)<sup>(6, 7)</sup>.

El seguimiento de la mayoría de los animales del estudio continuó más allá de los 3 primeros meses de tratamiento, realizándose en 29 de ellos chequeos clínicos, analíticas y pruebas de laboratorio a los 6 y/o 12 meses posteriores.



FIGURA 3. Toma de muestra para análisis sanguíneo. Foto: R. Tejada.

TABLA 3. Evolución clínica de los animales. Signos clínicos observados al inicio (T<sub>0</sub>) y a los 3 meses de tratamiento (T<sub>90</sub>). PU/PD: poliuria/polidipsia. EPD: Extremidad posterior derecha. QCS: Queratoconjuntivitis seca. IBD: Inflamación intestinal crónica. Valoración: ↑/↓= Leve ↑↑/↓↓= Moderado ↑↑↑/↓↓↓= Severo. \* La referencia numérica de los animales viene determinada por su orden de entrada en el ensayo. AA: extracto de *A. annua*, Al: alopurinol.

Grupo	Tto.	Ref. animal	Signos cutáneos		Linfadenopatías		Poliartritis		Signos fallo renal		Signos oculares		Otros		
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	
I	AA	1	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	
		2	No	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	Leve pérdida peso	Peso óptimo	
		3	Leve dermatitis descamativa	No	↑↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		6	No	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		9	No	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		20	Dermatitis descamativa Alopecia periorcular	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	Epistaxis nasal	No
		27	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
II	AA	5	Pápulas en orejas	Pápulas en orejas	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	
		7	No	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	
		10	Dermatitis descamativa en orejas	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		11	Lesiones en trufa Dermatitis periorcular	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	Mocos desde hace meses. Pérdida de peso	Disminución mucosidad Peso óptimo	
		12	Dermatitis descamativa	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	Leve pérdida de peso	Peso óptimo	
		13	Alopecia Hiperqueratosis plantar	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	Uveitis QCS	QCS	Pérdida de peso	Peso óptimo	
15	Alopecia periorcular Dermatitis pustular	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	QCS	Mejoría	Pérdida de peso	Peso óptimo				

TABLA 3. CONTINUACIÓN.

Grupo	Tto.	Ref. animal	Signos cutáneos		Linfadenopatías		Poliartritis		Signos fallo renal		Signos oculares		Otros		
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	
II	AA	16	Vasculitis auricular	No	Adenopatía generalizada	Mejora	No	No	No	No	No	Pérdida de peso	Peso óptimo		
			Seborrea generalizada	No	Adenopatía generalizada	Mejora	No	No	Queratitis	No	↑↑↑ Pérdida de peso	↑ Pérdida de peso			
		4	Costras auriculares	No	Adenopatía generalizada	Mejora	No	No	No	No	No	↑↑↑ Pérdida de peso (36,4 Kg)	Peso óptimo (36,4 Kg)		
			Úlceras en labios	No	Adenopatía generalizada	Mejora	No	No	No	No	No	↑↑↑ Pérdida de peso (26,6 Kg)	Peso óptimo (26,6 Kg)		
		28	Dematitis pustulosa severa	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	Severa	No	No	No	No	No	No	No	
			Alopecia y dermatitis descamativa periorcular	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	EPD	Leve	No	No	No	No	No	No	
		30	Alopecia Seborrea intensa	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	
			↑↑ Atrofia maseteros y cigomático	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	↑ Pérdida de peso	Peso óptimo	
		31	Alopecia Dematitis	Leves	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	Diarrea	IBD
			Alopecia Dematitis descamativa	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	No
		19	Alopecia	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	Caquexia (Peso 19,1 kg)	Peso óptimo (26,7 Kg)
			Alopecia bilateral muslos	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	Hiporexia	No
24	Dematitis papulosa	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	Sí	No	No	No	No	No	Hiporexia. ↓↓ Peso	Peso óptimo		
	Dematitis orbicular	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	Delgadez	Peso óptimo		
32	Alopecias rostrales	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	Delgadez	Peso óptimo		



TABLA 3. CONTINUACIÓN.

Grupo	Tto.	Ref. animal	Signos cutáneos		Linfadenopatías		Poliartritis		Signos fallo renal		Signos oculares		Otros	
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>
II	AA + AI	33	Heridas interdigitales	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	Sí	No	No	No	No	No	↓ Peso	Peso óptimo
			Hiperqueratosis plantar	No	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	No	No	↓ Peso
III	AA	25	Dematitis seborreica	No	↑ Adenopatía poplítea y preescapular	Leve	Sí	No	Sí	No	No	No	Pérdida de peso	Peso óptimo
			Alopecia	No	↑↑ Poplíteos	No	No	No	Sí	No	No	No	No	Atrofia muscular. Pérdida de peso
		Úlceras plantares	No	↑↑ Poplíteos	No	No	No	No	Sí	Sí	No	No	No	Peso óptimo
		Dematitis descamativa	No	↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	Leve	No	No	Sí	Sí	No	No	No	Mejora leve
		Dematitis seborreica generalizada	No	↑↑ Retrofaríngeos	↑↑ Retrofaríngeos	No	No	No	No	No	QCS	QCS	QCS	↓↓↓ Peso (58 Kg)
IV	AA + AI	21	Alopecias y dematitis seborreica	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	↓ Peso	Peso óptimo
			Dematitis descamativa	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	EPI	No	No	No	No	No	No	↓ Peso
IV	AA + AI	22	Vasculitis auricular	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	No	No	No	No	No	No	↓ Peso	Peso óptimo
			Dematitis seborreica	No	↑ Poplíteos	No	No	No	Sí	No	No	No	No	↓ Peso
IV	AA + AI	26	Alopecia	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	General	No	↑↑↑ PD/PU	↑↑ No PD/PU	No	No	Caquexia severa (36,25 Kg)	Peso óptimo (46,5 Kg)
			Dematitis descamativa severa	No	↑↑ Poplíteos	↑ Poplíteos	General	No	↑↑↑ PD/PU	↑↑ No PD/PU	No	No	No	Caquexia severa (36,25 Kg)

TABLA 4. Evolución de las analíticas sanguíneas de los animales según el grupo (grado de la enfermedad), valoradas al inicio del tratamiento (T<sub>0</sub>) y a los 3 meses de terapia (T<sub>90</sub>). En el análisis hematológico se evaluaron los parámetros referentes a la serie roja, serie blanca y plaquetas. En la bioquímica sérica se refleja la valoración de los parámetros renales y hepáticos.

Grupo (grado)	Tto.	Ref. animal	Hematología						Bioquímica sérica				
			S.R.		S.B.		PLT		Perfil renal		Perfil hepático		
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	
I (Leve)	AA	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		9	N	ND	N	ND	N	ND	N	ND	N	ND	ND
		20	↓↓	N	↓↓	N	↓	N	N	N	N	N	N
		27	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N↓
II (Moderada)	AA	5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		12	↓	N	N	N	↑↑	N	N	N	N	N	N
		13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		15	N	N	N	N	↓	N	N	N	N	N	N
		16	N	N	N	N	↑↑	N	N	N	N	N	N
		17	↓	N	N	N	↑↑	N	N	N	N	N	N
		4	↓	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	28	↓	N	N	N	N	N	N	N	N	↑↑ GPT ↑↑ FA	N	
	30	↓	N	N	↓	N	N	N	N	N	N	N	
	31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	AA + AI	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		19	N	↑	↑↑↑	↑	↑	N	N	N	N	N	N
		23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		24	↓↓	N	N	N	↑	N	N	N	N	N	N
32		↓↓	N	N	↑	↑↑	N	N	N	N	N	N	
33		↓↓	N	↓	N	N	↓	N	N	N	N	N	
34		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
III (Grave)	AA	25	↓↓	N	N	N	N	N	↑ Ur	N	N	N	
		18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		14	↓↓	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	AA + AI	21	↓↓	N	N	N	N	N	↑↑	N	↑↑	N	
		22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
IV (Muy grave)	AA	29	↓	N	N	N	N	N	↑↑ Ur ↑↑ Cre	N	N	N	
	AA + AI	26	N	N	N	N	↓↓	N	↑↑↑ Ur ↑↑ Cre	↑↑ Ur ↑ Cre	N	N	

TABLA 4. CONTINUACIÓN.

AA: extracto de *A. annua*, Al: alopurinol. Valoración: ND: No Determinado; N: Normal. ↓: ligeramente disminuido, ↓↓: moderadamente disminuido, ↓↓↓: muy disminuido, ↑: ligeramente aumentado, ↑↑: moderadamente aumentado, ↑↑↑: muy aumentado.  
 SR (serie roja, eritrocitos, 10<sup>6</sup>/μL). N: 5,39-8,7; ↓: < 5,39-4,5; ↓↓: < 4,5-4; ↓↓↓: < 4; ↑: > 8,7-9; ↑↑: > 9-9,5; ↑↑↑: > 9,5.  
 SB (leucocitos, 10<sup>3</sup>/μL). N: 4,9-17,6; ↓: < 4,9-4,5; ↓↓: < 4,5-3,5; ↓↓↓: < 3,5; ↑: > 17,6-18; ↑↑: > 18-20; ↑↑↑: > 20.  
 PLT (plaquetas, 10<sup>3</sup>/μL). N: 143-448; ↓: < 143-130; ↓↓: < 130-100; ↓↓↓: < 100; ↑: > 448-460; ↑↑: > 460-550; ↑↑↑: > 550.  
 Urea (mg/dL). N: 21-59, ↑: > 59-79, ↑↑: > 79-99, ↑↑↑: > 99.  
 Crea (creatinina, mg/dL). N: 0,5-1,5; ↑: > 1,5-2,5; ↑↑: > 2,5-4; ↑↑↑: > 4.  
 GPT (UI/L). N: 26-89, ↑: > 89-180; ↑↑: > 180-300; ↑↑↑: > 300.  
 FA (UI/L). N: 13-105; ↑: > 105-250; ↑↑: > 250-400; ↑↑↑: > 500.

TABLA 5. Resultados del proteinograma y urianálisis al inicio (T<sub>0</sub>) y a los 3 meses (T<sub>90</sub>). En el proteinograma se muestran los valores de proteínas totales, albúmina y globulina.

Grupo	Tto. Recibido	Ref. Animal	Proteinograma						Urianálisis	
			Pt		Alb		Glob		Proteinuria	
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T90
I (Leve)	AA	1	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		2	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		3	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		6	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		9	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		20	↓	N	↓	↓	↑	N	ND	ND
		27	N	N	N	N	N	N	ND	ND
II (Moderada)	AA	5	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		7	↑↑	↑	N	N	N	N	ND	ND
		10	↑	N	N	N	↑	N	ND	ND
		11	↑	N	N	N	N	N	ND	ND
		12	↑↑	N	↓	N	↑	N	ND	ND
		13	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		15	N	N	↓	N	N	N	ND	ND
		16	N	↑	↓↓↓	↓	↑	↑	ND	ND
		17	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		4	↑↑	N	↓	N	↑↑↑	N	ND	ND
	28	↑	↑	N	↓	↑	↑	ND	ND	
	30	N	N	N	N	N	N	ND	ND	
	31	N	N	↓	N	N	N	ND	ND	
	AA+Al	8	↑	N	↓↓↓	N	↑↑	N	ND	ND
		19	↑↑↑	↑	↓↓↓	↓	↑↑	N	ND	ND
		23	N	N	N	N	N	N	ND	ND
		24	↑	N	↓↓↓	N	↑	N	ND	ND
32		N	N	↓	N	↑	N	ND	ND	
33		↑↑	↑	↓	↑	↑↑	↑	ND	ND	
34		N	N	N	N	N	N	ND	ND	

Grupo	Tto. Recibido	Ref. Animal	Proteinograma						Urianálisis	
			Pt		Alb		Glob		Proteinuria	
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>
III (Grave)	AA	25	↑	↓	↓↓↓	↓↓	N	N	↑ (0,93)	N
		18	N	N	↓↓	N	N	N	↑↑ (1,47)	↑↑ (1,66)
		14	↑	N	↓↓	N	↑	N	↑↑ (1,22)	↑ (0,87)
	AA+AI	21	↓↓	N	N	N	N	N	↑↑ (1,03)	N
		22	N	N	↓	N	↑	N	↑ (1,26)	N
IV (Muy grave)	AA	29	↑↑	N	↓↓	N	↑↑	N	↑↑↑ (1,52)	↑ (1)
	AA+AI	26	N	N	↓↓	↓	N	N	↑↑↑ (5,2)	↑↑ (2)

TABLA 5. CONTINUACIÓN.

AA: extracto de *A. annua*, AI: alopurinol. Valoración: ND: No Determinado; N: Normal. Valoración: ND: No Determinado; N: Normal. ↓: ligeramente disminuido, ↓↓: moderadamente disminuido, ↓↓↓: muy disminuido, ↑: ligeramente aumentado, ↑↑: moderadamente aumentado, ↑↑↑: muy aumentado.

Pt (proteínas totales, g/dl). N: 4,8-7,8; ↓: < 4,8-4,5; ↓↓: < 4,5-4; ↓↓↓: < 4; ↑: > 7,8-8; ↑↑: 8,1-9; ↑↑↑: > 9,1.

Alb (albúmina, g/dl). N: 2,87-4,76; ↓: > 2,87- 2,5; ↓↓: < 2,5-2; ↓↓↓: < 2.

Glob (globulina, g/dl). N: 2,06-5,06; ↓: < 2,06-2; ↓↓: < 2-1,5; ↓↓↓: < 1,5; ↑: > 5,06-5,5; ↑↑: > 5,5-6; ↑↑↑: > 6. Proteinuria (ratio proteína/creatinina en orina): ausencia: < 0,2; borderline: 0,2-0,5; proteinuria > 0,5; ↑: 0,5-1; ↑↑: > 1-1,5; ↑↑↑: > 1,5.

## Resultados y discusión

### Grupo I: animales con enfermedad leve

Los 7 perros incluidos en este grupo se trataron únicamente con extracto de *A. annua*.

En los perros 6, 20 y 27 se observó una clara disminución en el título de anticuerpos, determinados por IFI (TABLA 6) a los 3 meses. Los animales se siguieron monitorizando hasta un año después, observándose en el 20 y el 27, valores negativos de anticuerpos (analizados mediante IFI (título de 1/40) y en el 6 ausencia de carga parasitaria medida por qPCR (TABLA 6).

Los perros 1, 2 y 3 evolucionaron bien al inicio del tratamiento. En el perro 1, sin embargo, se observó a los 3 meses un ligero aumento en los valores de anticuerpos (medidos por ELISA), hecho que pudiera explicarse por la falta de administración del extracto por parte del propietario, quien alegó que al no presentar el animal sintomatología clínica, no lo veía necesario.

En los perros 2 y 3 se observó a los 3 meses un recuento positivo de parásitos en hisopo. Estos animales sufrieron diferentes procesos patológicos que desencadenaron una progresión de la enfermedad: accidente traumático (animal 2) y ehrlichiosis (animal 3) que derivaron en aumento en el título de anticuerpos, de la carga parasitaria en sangre o piel y sintomatología clínica más de 6 meses después. En los casos 2 y 3 se trató de forma independiente cada uno de los procesos concomitantes y se instauró una dosis de extracto de 500 mg/kg/cada 12 horas. Un mes después de instaurada la nueva pauta de tratamiento, la disminución de la sintomatología clínica fue evidente. Tres meses después del segundo tratamiento pautado, la carga parasitaria fue escasa en el animal 2 (el recuento de parásitos en pelo pasó de 834,53 pp a ser negativo y en hisopo de 139.410,75 pp a 825,06 pp), en el animal 3 la carga parasitaria fue negativa. El título de anticuerpos (descendió de 1/320 a 1/160 y de 1/320 a 1/80 respectivamente).

TABLA 6. Resultados inmunológicos (IFI, ELISA) y parasitológicos (qPCR) al inicio del tratamiento (T<sub>0</sub>) y a los 3 meses de terapia (T<sub>90</sub>). Los resultados de IFI se expresan en título de anticuerpos (positivo > 1/40), los resultados de ELISA se expresan en densidad óptica normalizada (cut off SLA: 0,437; cut off PR: 0,508) y los resultados de qPCR se expresan en cantidad estimada de parásitos en la muestra. Valoración: +: positivo, -: negativo, ND: No determinado. AA: extracto de *A. annua*, AI: alopurinol.

Grupo	Tto.	Ref.	Análisis anticuerpos (en sangre)						Análisis carga parasitaria (qPCR)							
			IFI		ELISA SLA		ELISA PR		Sangre		Pelo		Hisopado			
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>		
I	AA	1	+ (1/320)	+ (1/320)	+ (0,533)	+ (0,875)	+ (0,565)	+ (0,821)	-	-	-	-	-	-		
		2	+ (1/80)	+ (1/80)	- (0,164)	+ (0,485)	- (0,11)	- (0,243)	+	+	+	+	+	+ (3,96)		
		3	+ (1/320)	+ (1/320)	+ (0,619)	+ (0,633)	- (0,1)	- (0,159)	-	-	-	-	-	-	+ (27,63)	
		6	+ (1/320)	+ (1/160)	+ (0,753)	+ (0,63)	- (0,212)	- (0,143)	-	-	-	-	-	-	-	
		9	+ (1/80)	ND	+ (0,785)	ND	+ (0,711)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		20	+ (1/160)	+ (1/80)	+ (0,534)	- (0,315)	- (0,242)	- (0,256)	-	-	-	-	-	-	-	+ (1,8)
		27	+ (1/640)	+ (1/80)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		5	+ (>1/280)	+ (>1/640)	+ (0,813)	+ (0,955)	+ (0,587)	+ (0,76)	-	-	+	+ (710,25)	+ (9,05)	+ (3,99)	+ (7,31)	
		7	+ (1/320)	+ (1/160)	+ (0,549)	+ (0,45)	+ (0,615)	+ (0,567)	-	-	-	-	+	+ (1,13)	-	
		10	+ (1/320)	- (1/40)	+ (0,958)	+ (0,523)	- (0,371)	- (0,204)	-	-	-	-	-	-	-	-
II	AA	11	+ (1/160)	+ (1/320)	+ (0,544)	+ (0,515)	- (0,436)	- (0,274)	-	-	+	+ (1,36)	-	+	+ (322,57)	+ (16,41)
		12	+ (1/320)	+ (1/320)	+ (0,640)	+ (0,705)	- (0,399)	- (0,495)	+ (2,22)	-	+	+ (623,08)	-	+	+ (2,907,27)	+ (1149,21)
		13	+ (1/1280)	+ (1/160)	- (0,426)	+ (0,883)	- (0,201)	+ (0,710)	-	-	-	-	-	-	-	-
		15	<sup>+</sup> (>1/280)	+ (1/640)	+ (0,684)	+ (1,005)	+ (0,611)	+ (1,457)	-	-	-	-	-	-	-	-
		16	+ (1/640)	+ (1/640)	- (0,662)	+ (1,017)	- (0,375)	+ (1,288)	-	-	-	-	-	-	-	-
		17	+ (1/640)	ND	+ (0,744)	ND	- (0,326)	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		4	<sup>+</sup> (>1/280)	+ (1/640)	+ (0,54)	+ (0,751)	- (0,159)	- (0,265)	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 6. CONTINUACIÓN.

Grupo	Tto.	Ref.	Análisis anticuerpos (en sangre)						Análisis carga parasitaria (qPCR)								
			IFI		ELISA SLA		ELISA PR		Sangre		Pelo		Hisopado				
			T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>90</sub>			
II	AA	28	+ (1/640)	+ (1/160)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		30	+ (1/1280)	+ (1/200)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		31	+ (1/640)	+ (1/640)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	8	+ (1/1280)	+ (1/640)	+ (0,875)	+ (0,791)	- (0,169)	- (0,280)	-	-	-	-	-	-	-	+ (100,92)	+ (18,30)	
	19	+ (>1/160)	+ (1/640)	+ (0,995)	+ (0,805)	+ (0,999)	+ (0,955)	+ (1,56)	-	-	+ (1,48)	-	-	-	+ (14,58)	-	
	23	+ (1/640)	+ (1/320)	+ (0,671)	+ (0,59)	- (0,395)	- (0,311)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA+AI	24	+ (>1/640)	+ (1/320)	+ (1,025)	+ (0,571)	+ (1,447)	+ (0,782)	-	-	-	-	-	-	-	+ (27,97)	+ (1,88)	
	32	+ (1/160)	+ (1/160)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	33	+ (1/160)	+ (1/160)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	34	+ (1/80)	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
III	Ar	25	+ (1/640)	+ (1/320)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		18	+ (1/320)	+ (1/80)	+ (0,448)	+ (0,463)	- (0,138)	- (0,125)	-	-	+ (14,81)	+ (2,62)	+ (23,70)	-	-	-	-
	14	+ (1/160)	+ (1/320)	- (0,394)	+ (0,686)	- (0,374)	+ (0,645)	-	-	+ (7,21pp)	+ (5,21)	+ (13,736,33 pp)	+ (5,80 pp)	-	-	-	
	21	+ (>1/640)	+ (1/320)	+ (0,892)	+ (0,474)	+ (1,382)	+ (1,116)	-	-	-	-	-	-	-	+ (1,545,79)	-	
AA+AI	22	+ (>1/640)	+ (1/640)	+ (1,051)	+ (0,865)	+ (1,014)	- (0,371)	+ (4,65)	-	+ (24,791,67)	+	-	-	-	-	-	
	29	+ (>1/640)	+ (1/320)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
IV	AA+AI	26	+ (>1/1280)	+ (>1/1280)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

El perro 9 abandonó el estudio antes del control de los tres meses porque el dueño refirió un estado óptimo del animal y no quería someterlo a más pruebas.

### Grupo II: animales con enfermedad moderada

La sintomatología clínica asociada (TABLA 3), tanto en los animales tratados solo con el extracto como en aquellos que recibieron también alopurinol, remitió totalmente tras

tres meses de tratamiento, observándose una mejoría notable durante el primer mes (FIGURAS 4 y 5).

Las alteraciones analíticas (TABLA 4) se normalizaron tanto en los tratados solamente con extracto como en los que se añadió alopurinol. El perro número 19 presentaba una importante leucocitosis que, si bien mejoró a los 3 meses hasta ser leve, necesitó un mes más para normalizarse.



FIGURA 4. Animal 8 (Grupo II): lesiones alopécicas descamativas en la zona periocular y en la extremidad anterior derecha, antes del tratamiento (A, B). Mejora evidente después del tratamiento (C, D).



FIGURA 5. Animal 19 (Grupo II): caquexia (19,1 Kg) antes del tratamiento (A). Recuperación (26,7 Kg), tres meses después (B).

El proteinograma (TABLA 5) mejoró progresivamente tanto en los animales tratados con extracto de *A. annua* como en los tratados con extracto y alopurinol. Todos estos animales siguieron controlándose, y se observó una normalización de los valores en el proteinograma tras seis meses de tratamiento. El uronálisis en estos perros no se realizó por no presentar alteraciones en el perfil renal.

En cuanto a la evolución de la respuesta de anticuerpos por IFI (TABLA 6), en la inmensa mayoría de los casos se observó una disminución (perros 4, 5, 7, 8, 13, 15, 19, 23, 24, 28 y 30), permaneció más o menos inalterada (perros 1, 2, 3, 12, 16, 31 y 32), e incluso fue negativa (perros 10 y 34) Si comparamos estos resultados con los obtenidos en los análisis inmunológicos por ELISA observamos que en los perros 5, 12, 13, 15 y 16 hay un aumento en los valores obtenidos a los 3 meses. Los cuatro últimos perros fueron diagnosticados posteriormente de diferentes patologías que pueden afectar al sistema inmune *per se* o bien por el efecto del tratamiento de elección para su resolución: el perro 12 fue diagnosticado de enteritis linfoplasmocitaria severa. A los perros 13 y 15 se les diagnosticó atopia y fueron tratados durante meses con oclacitinib maleato, potente inhibidor de las enzimas Janus quinasa (JAK), que puede inhibir no sólo las citoquinas proinflamatorias sino también aquellas implicadas en la defensa del hospedador, con sus potenciales efectos no deseados. El perro 16 fue diagnosticado de toxoplasmosis.

En referencia a la carga parasitaria (TABLA 6), se observa en todos los casos una disminución evidente en cada una de las muestras procesadas, llegando a negativizarse en muchos casos. Sólo en el perro 5 observamos un leve aumento en el número de parásitos estimados en hisopo de oído.

El perro 17 abandonó en los primeros meses por dificultad en la administración del tratamiento; sin embargo, se ha incluido porque a pesar de no tener resultados inmunológicos, su control hematológico a los tres meses fue muy satisfactorio, así como su sintomatología clínica.

### Grupo III: animales con enfermedad grave

La mejora en la sintomatología clínica (TABLA 3) fue evidente durante el primer mes, hasta remitir en los tres primeros meses de tratamiento en todos los perros, tanto en los 3 tratados solo con extracto como en los dos a los que también se les administró alopurinol (FIGURAS 6 y 7).

Las alteraciones analíticas (TABLA 4) se normalizaron a los 3 en ambos grupos.

La mejora en los resultados en el proteinograma (TABLA 5) es evidente a los tres meses de tratamiento tanto en los animales tratados con el extracto de *A. annua* como en los que se añadió alopurinol; la normalización en ambos grupos se produjo tras seis meses de tratamiento.

En referencia a la proteinuria (TABLA 5), observamos que, después de 3 meses de tratamiento, en los perros 14 y 18 descendió mientras que en los perros 21, 22 y 25 remitió completamente.





FIGURA 6. Animal 4 (Grupo III): caquexia (26,6 Kg) y lesiones descamativas generalizadas antes del tratamiento (A). Condición corporal recuperada (36,4 Kg), tres meses después (B).

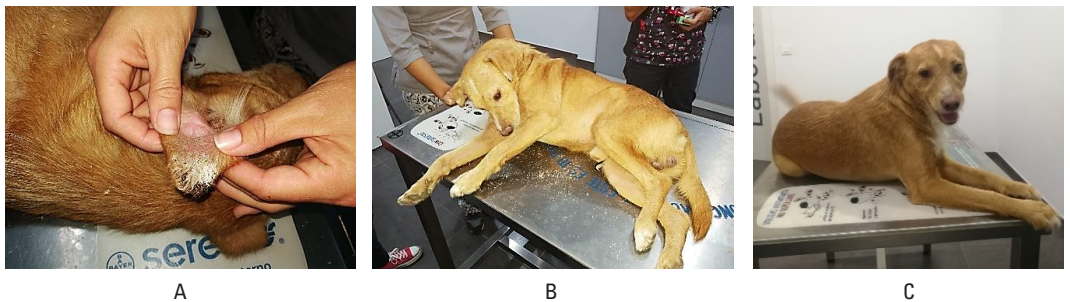


FIGURA 7. Animal 22 (Grupo III): vasculitis periférica (A) y seborrea (B) antes del tratamiento. Recuperación de las lesiones dérmicas y el estado general, tres meses después (C).

En cuanto a la respuesta inmunológica (TABLA 6), se observó en todos los casos una disminución del título de anticuerpos medidos por IFI (así como por ELISA en los animales 21 y 22) salvo en el perro 14, en el que observamos un aumento del nivel de anticuerpos con ambas técnicas; este animal padecía una enfermedad crónica respiratoria antes de su diagnóstico clínico de leishmaniosis y, aunque la sintomatología clínica asociada a la misma mejoró, no pudimos continuar controlando su evolución debido a la decisión del propietario de realizar eutanasia humanitaria por su patología respiratoria antes de realizar el siguiente control analítico más allá de los tres meses.

La carga parasitaria (TABLA 6), descendió en todos los animales tras tres meses de tratamiento, llegando a hacerse

negativa en todas las muestras analizadas en el caso de los perros 21 y 22.

En los animales 26 y 29 se observó mejoría en la sintomatología clínica (TABLA 3) tras tres meses de tratamiento, aunque la evolución favorable fue evidente ya a los dos meses.

Las alteraciones analíticas tanto sanguíneas (TABLA 3) como de orina (TABLA 5) mejoraron de forma progresiva en los tres primeros meses de tratamiento hasta ser estables a los seis. Es necesario mencionar que dicha estabilidad no supone una normalización absoluta, ya que los perros incluidos en esta fase suelen presentar síndrome nefrótico asociado; sin embargo, la mejora permite un mayor índice de supervivencia, así como mayor calidad de vida; hasta el

punto de que ambos perros siguen vivos y estables un año y medio después. Por supuesto, en estos casos el control del daño renal asociado es fundamental una vez diagnosticado. La principal diferencia en la evolución clínica se observó en la mejora en el proteinograma (TABLA 5) siendo más rápida en el caso del perro al que se administró alopurinol junto al extracto.

En ambos animales la evolución de la respuesta inmunitaria se analizó únicamente mediante IFI (TABLA 6). Con esta técnica inmunológica se observó un descenso en el título de anticuerpos, si bien no son perceptibles en los valores de la IFI del perro 26, sí pueden apreciarse en los valores de ELISA equivalentes determinados en laboratorio externo, de forma que en el primer control el valor de la ratio fue de 7,6 y tres meses después la ratio fue de 5,4 (ambos valores tienen una equivalencia de títulos de anticuerpos en IFI mayores a 1/1280). Debido a localización geográfica o a la imposibilidad a la hora de recoger las muestras adecuadamente, no se pudieron realizar las mediciones inmunológicas por ELISA (SLA/PR) ni de la carga parasitaria en ninguno de estos dos animales.

### Seguridad

No se reportaron efectos adversos tras la administración del extracto durante el tiempo del estudio. Los propietarios de los perros que abandonaron el ensayo antes de 3 meses (animales 9 y 17) refirieron dificultad para administrar el protocolo pautado, pero no notificaron ningún efecto adverso durante el tiempo en que los animales recibieron el tratamiento.

### Conclusiones

La administración del extracto de *A. annua* no provocó efectos adversos en ninguno de los animales que participaron en este ensayo. Aunque el estudio revela datos obtenidos durante tres meses, la mayoría de los animales siguieron tratándose y controlándose analíticamente hasta un año después sin reportar efectos secundarios asociados.

En todos los casos se observó una mejora clínica evidente a los tres meses de tratamiento, sin apreciarse diferencias entre los casos tratados sólo con el extracto y aquellos que recibieron además alopurinol, excepto una normalización más precoz en el título de anticuerpos en los animales suplementados con alopurinol.

En los 24 animales en los que se analizó, la disminución de la carga parasitaria fue evidente a los tres meses, no detectándose parásitos en ninguna de las muestras (sangre, piel, pelo, cerumen, etc.) en los controles realizados tras seis meses de comenzado el tratamiento, tanto en los

perros tratados solo con extracto como en los que se añadió alopurinol.

A tenor de los resultados obtenidos, *Artemisia annua* es una alternativa terapéutica a considerar en el tratamiento y control de la leishmaniosis canina; sin embargo, son necesarios futuros estudios que impliquen un mayor número de animales, y la inclusión de grupos control.

### Agradecimientos

A nuestros compañeros de profesión: Nahir Covelo Saavedra (Pontevedra), Marta Baldé Ibáñez (Madrid), Sergio Lorente Tomás (Valencia), Alicia Blanco Martín (Valladolid), Alberto Morales Ruiz (Málaga) y Andrea Álvarez Foullioux (Madrid), por los casos aportados.

Al Laboratorio LeishmanCeres, de la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, por su colaboración en los análisis inmunológicos y de qPCR.

### Referencias bibliográficas

- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi M, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 2011; 4: 86. Disponible en <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/86>. Consultada: 17/11/2020.
- Nsengiyumva Bati Daddy, Luc Malemo Kalisya, Pascal Gisenya Bagire, Robert L. Watt, Melissa J. Towler, Pamela J. Weathers. *Artemisia annua* dried leaf tablets treated malaria resistant to ACT and i.v. artesunate: Case reports. *Phytomedicine* 2107; 32: 37-40. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.04.006> Consultado: 17/11/2020.
- 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; 5: 626. Erratum in: *Front Microbiol.* 2015; 6: 1015.
- 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. *Tropical Diseases* 2015; 9 (1): e3321. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287499/>. Consultada: 17/11/2020.
- 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.
- Belinchón-Lorenzo S, Iniesta V, Parejo JC, Fernández-Cotrina J, Muñoz-Madrid R, Soto M, Alonso C, Gómez Nieto LC. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2013; 192 (1-3): 43-50.
- Belinchón-Lorenzo S, Parejo JC, Iniesta V, Fernández-Cotrina J, Muñoz-Madrid R, Monroy I, Baz V, Gómez-Luque A, Serrano-Aguilera FJ, Barneto JL, Gómez-Nieto LC. First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR. *Vet Parasitol.* 2016; 228: 65-68.