

ÚS DE FITOTERÀPIA EN LA LEISHMANIOSI CANINA

VILAMALA COMAS, JANA¹

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Av. Joan XXIII, 27-31. 08028 Barcelona

Abstract

Canine leishmaniasis is a vector parasitic disease caused by *Leishmania infantum* in the Mediterranean basin that represents a frequent pathology in the veterinary clinic and a public health problem. Throughout history, many plant products have been used to treat this disease in humans, which is why this paper reviews the use of phytotherapy in canine leishmaniasis. First of all, the results of a bibliographic review of plant product studies made *in vitro* and *in vivo* on the *Leishmania infantum* species are presented, with results of IC₅₀ and relevant effectiveness. Secondly, research based on the *Artemisia annua* L. species is presented, as the literature shows that preparations from various parts of this plant act upon different species of *Leishmania* and can be effective in the treatment of canine leishmaniasis.

Keywords: canine leishmaniasis, phytotherapy, *Artemisia annua* L.

Resumen

La leishmaniosis canina es una enfermedad parasitaria vectorial causada por *Leishmania infantum*. Se localiza en la cuenca mediterránea y supone una patología frecuente en la clínica veterinaria y un problema de salud pública. A lo largo de la historia se han utilizado múltiples productos de plantas para el tratamiento de esta enfermedad en humanos. Por esta razón, en este estudio se lleva a cabo una revisión del uso de la fitoterapia en la leishmaniosis canina.

En la primera parte se presentan los resultados de la investigación bibliográfica de estudios de plantas realizados *in vitro* e *in vivo*, centrada en la especie *Leishmania infantum*, con resultados de IC₅₀ y efectividad relevantes.

En la segunda, la investigación se basa en la especie *Artemisia annua* L., ya que la bibliografía muestra que preparados de diversas partes de esta planta tienen actividad sobre diferentes especies de *Leishmania* y efectividad en el tratamiento de la leishmaniosis canina.

Palabras clave: leishmaniosis canina, fitoterapia, *Artemisia annua* L.

Resum

La leishmaniosi canina és una malaltia parasitària vectorial causada per *Leishmania infantum*. Es localitza a la conca mediterrània i representa una patologia freqüent en la clínica veterinària i un problema de salut pública. Al llarg de la història s'han utilitzat molts productes de plantes per al tractament d'aquesta malaltia en humans. Per aquest motiu, en aquest treball es fa una revisió de l'ús de la fitoteràpia en la leishmaniosi canina.

Primerament es presenten els resultats de la recerca bibliogràfica d'estudis de productes de plantes realitzats *in vitro* i *in vivo*, centrada en l'espècie *Leishmania infantum*, amb resultats de IC₅₀ i efectivitat rellevants.

En la segona part, la recerca es basa en l'espècie *Artemisia annua* L., ja que la bibliografia mostra que preparats de diverses parts d'aquesta planta tenen activitat sobre diferents espècies de *Leishmania* i efectivitat en el tractament de la leishmaniosi canina.

Paraules clau: leishmaniosi canina, fitoteràpia, *Artemisia annua* L.

¹ Llicenciada en Veterinària per la Universitat Autònoma de Barcelona i graduada en Farmàcia per la Universitat de Barcelona; janavilamala@gmail.com.

1. Introducció general/contextualització

La leishmaniosi canina és una malaltia parasitària causada per *Leishmania infantum*, un protozou flagel·lat que es transmet vectorialment mitjançant l'activitat hematòfaga del flebotom (Organització Mundial de la Salut, 2018). Els tractaments farmacològics actuals presenten alguns inconvenients, com la llargada, el cost, els efectes adversos i la resistència als fàrmacs (Reguera *et al.*, 2016). Tot això fa que sigui necessari buscar alternatives per a la millora del tractament.

A causa de la meua formació com a veterinària, he volgut centrar aquest treball de final de grau en la recerca d'estudis de preparats de plantes que tinguin activitat sobre *Leishmania infantum* i que a la llarga puguin representar un complement o una alternativa en el tractament de la leishmaniosi canina. És per això que primerament es mostren els resultats de la recerca dels estudis de preparats de plantes que presenten activitat sobre *L. infantum in vitro* i tot seguit els estudis rellevants de productes de plantes realitzats *in vivo*, els quals podrien representar un complement per al tractament de la leishmaniosi canina. Els resultats de la recerca *in vivo* mostren un article de Tejada (Tejada, 2016) en què s'avaluen quatre casos clínics de leishmaniosi canina tractats amb un preparat d'*Artemisia annua* L. És per això que s'aprofundeix en els articles que estudien l'activitat i l'efectivitat de diversos preparats d'aquesta planta, i també el seu mecanisme d'acció. Finalment, es presenta un cas clínic real basat en l'experiència personal, en el qual es valora el tractament de la leishmaniosi canina amb un preparat d'*Artemisia annua* L.

2. Objectius

Els objectius d'aquest treball són:

- Fer una revisió sistemàtica dels estudis de productes de plantes publicats *in vitro* i *in vivo* en *Leishmania infantum* i valorar la seva activitat.
- Fer una recerca bibliogràfica sobre els estudis realitzats *in vitro* i *in vivo* amb productes de la planta *Artemisia annua* L. per valorar primerament la seva activitat i tot seguit la seva possible efectivitat en el tractament de la leishmaniosi canina.
- Avaluar clínicament i de manera personal el tractament de la leishmaniosi canina amb un preparat d'*Artemisia annua* L.

3. Materials i mètodes

La recerca d'informació per dur a terme aquest treball s'ha basat en la consulta de llibres, revisions i articles amb informació rellevant sobre fitoteràpia i leishmaniosi canina. Per a la localització de les fonts bibliogràfiques s'han utilitzat bases de dades com PubMed i cercadors bibliogràfics com Google Academic.

En la recerca inicial es van usar paraules clau com «medicinal plant», «herbal extract» i «leishmaniasis», en la qual es va aplicar el filtre «reviews» per tenir una visió àmplia dels estudis fets al llarg de la història. Pel que fa als estudis *in vitro*, es van seleccionar els realitzats durant els últims vint anys i els que s'havien centrat en l'espècie *Leishmania infantum*. Per als estudis *in vivo* es van seleccionar tots els que es van trobar fets en l'espècie canina. Durant la recerca es va trobar un estudi publicat per Rosa Tejada en què es presenten quatre casos clínics de gossos amb leishmaniosi tractats amb extracte de fulla d'*Artemisia annua* L. en la seva clínica veterinària. Després de parlar amb l'autora com a companya d'ofici, es va decidir buscar tota la bibliografia relacionada amb *Artemisia annua* L. i leishmaniosi.

Per a aquesta recerca es van utilitzar paraules específiques com «*Artemisia annua*» i «*Leishmania infantum*», les quals es van combinar amb paraules més generals, com «*Leishmania*» i «*Canine leishmaniasis*», per tal d'abastar el màxim d'informació. A partir d'aquí es van seleccionar els articles que s'adequaven als criteris de recerca i permetien complir els objectius establerts.

4. Resultats i discussió

4.1. Leishmaniosi Canina

La leishmaniosi és un grup de malalties causades per diferents espècies del gènere *Leishmania* (Organització Mundial de la Salut, 2018), protozous flagel·lats de l'ordre Kinetoplastida i família *Trypanosomatidae*.

Aquest paràsit infecta el sistema fagocític mononuclear del seus hosts mamífers i es transmet mitjançant l'activitat hematòfaga de les femelles flebòtoms dels gèneres *Lutzomyia* (Nou Món) i *Phlebotomus* (Vell Món) (Baneth *et al.*, 2008).

A nivell mundial, hi ha unes setanta espècies de mamífers, incloent-hi els humans, considerades hosts vertebrats de diferents espècies de *Leishmania* i algunes d'elles són reservoris del paràsit. El principal reservori per als humans és el gos, la qual cosa dona lloc a un problema veterinari i de salut pública (Ribeiro *et al.*, 2018).

4.1.1. Epidemiologia i distribució

La leishmaniosi canina és endèmica en més de setanta països del món, present a regions del sud d'Europa, Àfrica, Àsia, Amèrica del Sud, Amèrica Central i als EUA (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Dins d'Europa es troba àmpliament distribuïda per la conca mediterrània.

A Espanya la leishmaniosi canina és causada per *Leishmania infantum*, única espècie present al país i agent causal de la leishmaniosi visceral, cutània i mucocutània en humans (Aliaga *et al.*, 2003). Aquesta espècie és la que té major distribució mundial i l'única present en el Nou Món i el Vell Món, on alguns autors prefereixen anomenar-la *L. chagasi* (Baneth *et al.*, 2008). La leishmaniosi canina visceral és endèmica i la seva prevalença varia segons la regió d'Espanya. Diferents estudis han demostrat que la prevalença varia entre el 4% i el 35% de gossos seropositius, tot i que molts d'ells no desenvolupen la malaltia (1,5).

La distribució de la malaltia presenta un patró bimodal, amb una prevalença més elevada en gossos de menys de tres anys i més de vuit (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Algunes races de gossos, com les de bòxer, cocker spaniel, rottweiler i pastor alemany, semblen ser més susceptibles al desenvolupament de la malaltia, mentre que d'altres, com el ca eivissenc, rarament desenvolupen signes clínics (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

4.1.2. Cicle biològic i transmissió

El cicle complet de la *Leishmania* té lloc en dos hosts: un vector flebòtom que transmet la forma flagel·lada, el promastigot, i un mamífer, on la forma intracel·lular amastigot es desenvolupa i es replica (figura 1). Les femelles flebòtoms són l'únic artròpode adaptat per a la transmissió biològica de *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Quan una femella flebòtom hematòfaga pica un hoste parasitat, ingereix macròfags infectats per les formes amastigots (formes rodones i no mòbils). Dins del flebòtom, el paràsit es transforma a l'estat flagel·lat promastigot, es multiplica per fissió binària a l'intestí mitjà i migra a l'intestí proximal i a la vàlvula faríngia. Quan la femella hematòfaga ingereix sang d'un altre hoste mamífer, inocular els promastigots a la pell del nou hoste, on són fagocitats per macròfags. En els macròfags de l'hoste mamífer és on el paràsit evoluciona a la forma amastigot i on es reproduïx de manera asexual fins a produir la ruptura dels macròfags. El paràsit es propaga mitjançant el sistema fagocític mononuclear a diferents òrgans, principalment a la melsa, el fetge, la medul·la òssia i els limfonodes (Ribeiro *et al.*, 2018).

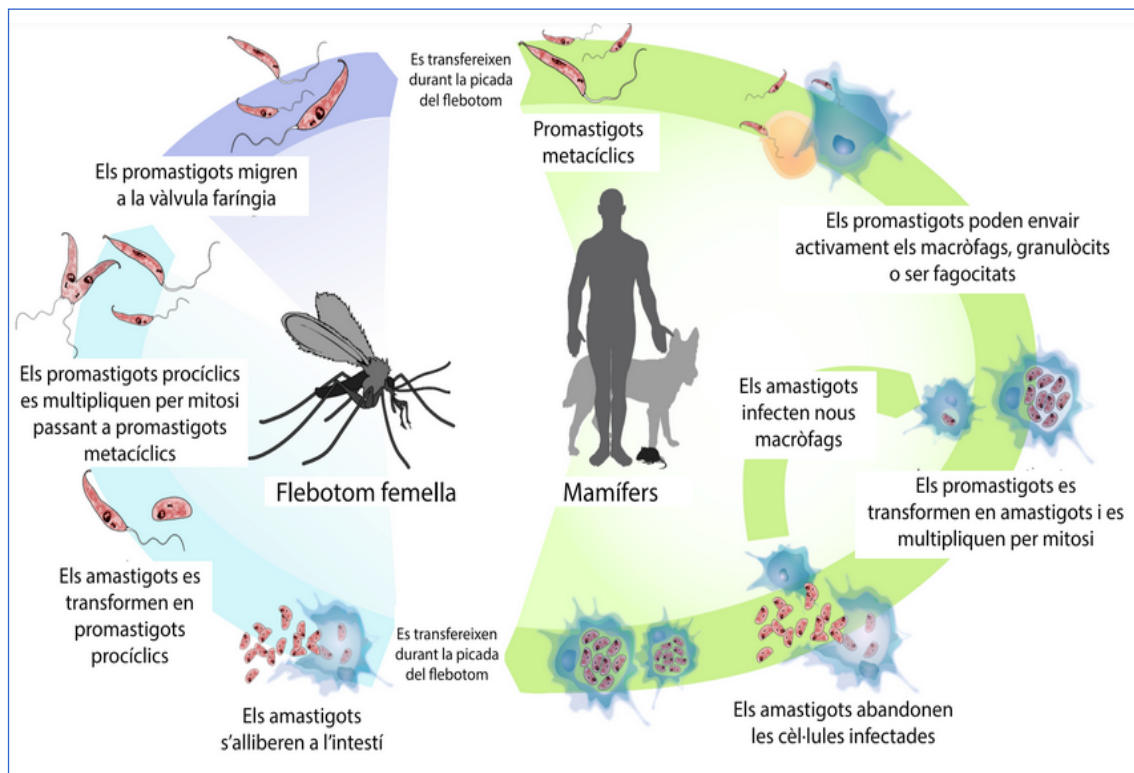


Figura 1. Cicle biològic de la leishmanària (adaptació de Tejada, 2016).

4.1.3. Manifestacions clíniques

La leishmaniosi canina és una malaltia sistèmica que pot involucrar qualsevol òrgan, teixit o fluid corporal i que es manifesta amb signes clínics inespecífics (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Presenta una àmplia varietat de formes clíniques i diferents graus de severitat, la qual cosa dificulta el seu diagnòstic en la pràctica clínica diària. Les principals manifestacions clíniques i de laboratori de la malaltia es resumeixen a la taula 1.

TAULA 1. PRINCIPALS MANIFESTACIONS CLÍNIQUES I DE LABORATORI DE LA LEISHMANIOSI CANINA (Adaptació de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

MANIFESTACIONS CLÍNIQUES	MANIFESTACIONS DE LABORATORI
Generals • Limfadenopatia generalitzada • Pèrdua de pes • Augment o disminució de la gana • Letargia • Mucoses pàl·lides • Esplenomegàlia • Poliúria i polidípsia • Febre • Vòmits • Diarrea (incloent-hi colitis crònica)	Proteïnes sèriques i electroforetograma • Hiperglobulinèmia • Hipoalbuminèmia • Ràtio albúmina/globulina disminuïda
Cutànies • Dermatitis exfoliativa no prurítica amb o sense alopecia • Dermatitis erosiva ulcerativa • Dermatitis nodular • Dermatitis papular • Dermatitis postular • Onicogrifosi	CBC/hemostàsia • Anèmia no regenerativa • Leucocitosi o leucopènia • Trombocitopatia • Trombocitopènia • Disminució de l'hemostàsia secundària i fibrinòlisi
Oculars • Blefaritis (exfoliativa, ulcerativa o nodular) i conjuntivitis • Queratoconjuntivitis • Uveïtis anterior/endoftalmitis	Perfil bioquímic/anàlisi d'orina • Proteïnúria • Azotèmia renal • Activitat enzimàtica hepàtica elevada
Altres • Úlceres mucocutànies i de les mucoses o lesions nodulars • Epistaxi • Coïxesa • Miositis masticatòria atròfica • Desordres vasculars • Desordres neurològics	

4.1.4. Mecanisme de la malaltia

Pel que fa a la resposta immunitària de l'hoste, existeix una dicotomia entre la resposta immunitària cel·lular Th1 i la resposta humoral Th2. El desequilibri cap a un cantó o cap a l'altre inclinarà la balança cap a l'eliminació dels signes clínics (Th1) o cap a la seva progressió (Th2) (Koutinas i Koutinas, 2014).

Tal com s'observa en la figura 2, la resposta Th1, amb la participació de citocines interferó- γ (INF- γ), factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) i interleuquina 12 (IL-12), comporta l'activació dels macròfags i l'eliminació del paràsit a través de la síntesi d'òxid nítric; en canvi, la resposta Th2, amb la participació d'interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 10 (IL-10) i el factor de creixement transformador beta 1 (TGF- β), comporta una resposta humoral amb síntesi d'immunoglobulines, inactivació dels macròfags i disseminació del paràsit (Baneth *et al.*, 2008).

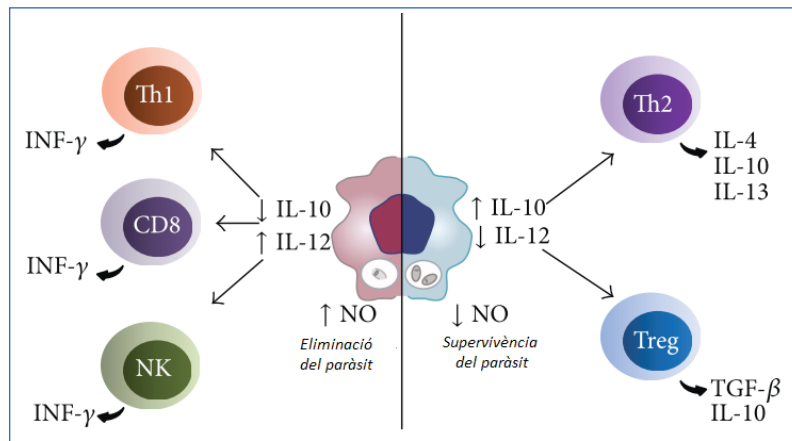


Figura 2. Regulació de la resposta immunitària en la infecció per *Leishmania* (adaptació de Rodrigues *et al.*, 2015).

4.1.5. Diagnòstic

La leishmaniosi canina és una malaltia que presenta un quadre complex i inespecífic, de manera que moltes vegades una analítica rutinària d'hemograma, perfil bioquímic i uroanàlisi no permet diagnosticar-la. A més, els gossos amb leishmaniosi poden estar coinfectats amb altres malalties, la qual cosa dificulta el diagnòstic diferencial (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Els principals mètodes de diagnòstic descrits per a la detecció de *L. infantum* són de tres tipus:

- Serològics. El diagnòstic de la leishmaniosi canina es pot fer mitjançant la detecció d'anticossos específics en sèrum (IgG) i usant tècniques serològiques quantitatives: enzimoinmunoassaig sobre fase sòlida (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) i immunofluorescència indirecta (*Immunofluorescence Antibody Test*, IFAT). Els tests qualitius basats en la immunocromatografia són fàcils i ràpids d'usar, però el seu rendiment no és òptim (Solano-Gallego *et al.*, 2011).
- Parasitològics
 - Citologia/histopatologia. La citologia és una tècnica ràpida i no invasiva que permet la detecció directa del paràsit. Els principals patrons que podem trobar suggestius de *L. infantum* en una mostra d'òrgans o fluids corporals són els següents:
 - Inflamació macrofàgica
 - Inflamació neutrofílica-macrofàgica
 - Inflamació limfoplasmàtica
 - Hiperplàsia reactiva en òrgans limfoides
 - Nombre variable d'amastigots de *Leishmania* intracel·lulars o extracel·lulars.

Els principals inconvenients d'aquesta tècnica són que presenta una baixa sensibilitat, es necessita experiència per a la visualització del paràsit, no identifica l'estat immunològic de l'animal i requereix altres mètodes de diagnòstic quan no es veu el paràsit.

- Cultiu. El cultiu del paràsit és una tècnica lenta i laboriosa, ja que requereix un mes per al resultat i s'utilitza només en laboratoris de recerca.

- Moleculars. La detecció de DNA de *Leishmania* en teixits per reacció en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) permet un diagnòstic sensible i específic de la

infecció. La PCR es pot realitzar amb DNA extret de teixits, sang, fluids corporals o elements histopatològics. Segons Solano-Gallego *et al.* (Solano-Gallego *et al.*, 2011), els assajos basats en la detecció de DNA del paràsit, anomenat DNA cinetoplast (kDNA), són els més sensibles per a la detecció directa en teixits infectats. La PCR a temps real permet la quantificació de la càrrega parasitària de *Leishmania* en teixits de gossos infectats, la qual cosa és útil per al diagnòstic i el seguiment durant el tractament. Cal remarcar que la informació obtinguda per PCR sempre ha d'anar acompanyada de les dades obtingudes en l'avaluació clinicopatològica i serològica.

El diagnòstic compatible amb leishmaniosi es confirma amb la presència d'un elevat nivell d'anticossos en un gos amb signes clínics i/o anormalitats clinicopatològiques.

En la figura 3 es resumeix el procediment que es duu a terme en la clínica veterinària diària per diagnosticar la leishmaniosi canina.

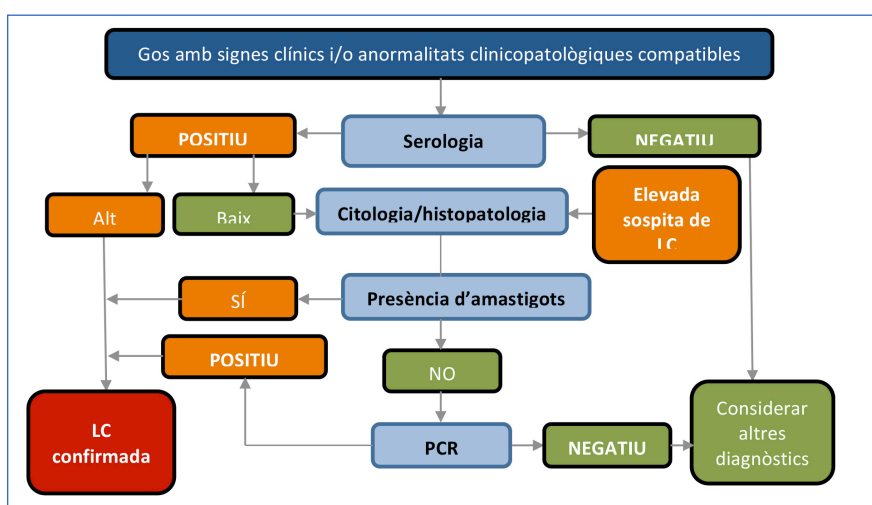


Figura 3. Diagrama de flux per al diagnòstic de gossos amb signes clínics sospitosos de leishmaniosi canina (adaptació de Solano-Gallego *et al.*, 2011). LC: leishmaniosi canina.

4.1.6. Prevenció

La leishmaniosi canina és una malaltia vectorial i un problema de salut pública; per tant, el primer que cal afrontar és la prevenció de la malaltia. Hi ha diverses presentacions farmacèutiques que contenen insecticides, de les quals principalment s'utilitzen les pipetes de permetrina o flumetrina i els collars impregnats de deltametrina.

La vacunació també és una eina útil, però les poques marques comercials presents en el mercat tenen una eficàcia baixa, entre el 68-71% (Baneth *et al.*, 2008). Com que cap dels sistemes de prevenció té un 100% d'eficàcia, la millor forma de control és utilitzar la vacunació juntament amb els insecticides tòpics (Ribeiro *et al.*, 2018).

4.1.7. Tractament

En medicina veterinària, el tractament més freqüent per a la leishmaniosi canina és l'antimoniato de meglumina (antimoniato pentavalent) administrat per via subcutània cada 24 hores durant un mes a una dosi de 100 mg/kg juntament amb l'al·lopurinol, administrat per via oral cada 12 hores a una dosi de 10 mg/kg durant un mínim de sis mesos. La duració del tractament depèn de la severitat de la malaltia, la tolerància individual als fàrmacs i la resposta clínica al tractament (Ribeiro *et al.*, 2018).

Els antimonials pentavalents són molècules hidrosolubles amb dificultat per ser absorbides per via digestiva. L'activitat d'aquest fàrmac es basa en la reducció de Sb^V a la forma tòxica Sb^{III} per la forma amastigot de *Leishmania*. Aquesta forma reduïda causa la inhibició enzimàtica de diversos processos metabòlics essencials per al paràsit i altera la balança redox de sulfur, responsable de la prevenció dels efectes tòxics de les espècies reactives d'oxigen (ROS) en el paràsit. A més, el Sb^{III} competeix amb el zinc en el seu lligam a proteïnes específiques involucrades en les interaccions entre proteïnes d'àcids nucleics, fet que causa la fragmentació del DNA responsable de l'apoptosi en trypanosòmids. La reducció que pateix el Sb^V a Sb^{III} a nivell hepàtic és responsable dels efectes tòxics que presenten els antimonials. Aquest fàrmac pot comportar dolor al lloc d'injecció, tromboflebitis, desordres gastrointestinals, nefrotoxicitat, hiperproteïnèmia esporàdica i abatiment (Reguera *et al.*, 2016).

L'al·lopurinol és un anàleg de la base púrica hipoxantina i un inhibidor enzimàtic de la xantina-oxidasa. Aquest fàrmac és metabolitzat pel paràsit i actua inhibint la seva síntesi proteica. En tractaments llargs presenta alguns efectes secundaris, com ara xantinúria, mineralització renal i urolitiasis (Reguera *et al.*, 2016).

La miltefosina és el fàrmac de segona elecció en la leishmaniosi canina, ja que s'ha vist que la seva eficàcia terapèutica en combinació amb l'al·lopurinol és inferior.

Per altra banda, existeixen fàrmacs immunomoduladors que poden servir com a preventius o per reduir el risc de desenvolupament de la malaltia. La domperidona estimula els mecanismes de defensa innats i activa la resposta immunitària Th1 i l'alliberament de $IFN-\gamma$, IL-12 i $TNF-\alpha$, que potencien l'eliminació del paràsit (Ribeiro *et al.*, 2018). S'administra per via oral a una dosi de 0,5 mg/kg/ cada 24 hores durant quatre setmanes, segons la prevalença temporal de la zona endèmica. Pel que fa als efectes adversos, pot donar apatia i trastorns gastrointestinals (Reguera *et al.*, 2016).

4.2. Fitoteràpia i leishmaniosi

Els principals problemes que presenten els tractaments veterinaris actuals són la toxicitat, el cost, la durada, els efectes adversos i la resistència del paràsit als fàrmacs (Reguera *et al.*, 2016). Tot això fa necessària la recerca de nous tractaments per a la malaltia i la fitoteràpia representa una alternativa que pot arribar a ser segura, efectiva i econòmicament assequible.

4.2.1. Estudis *in vitro*

Al llarg de la història s'han utilitzat moltes plantes medicinals per al tractament de la leishmaniosi. En la recerca inicial basada en estudis realitzats *in vitro* amb productes de plantes es va observar que la majoria d'estudis centrats a valorar la seva activitat s'han fet als països on la malaltia té la prevalença més alta i en l'espècie de *Leishmania* que afecta l'humà en aquests països, principalment el Brasil, l'Índia i l'Iran. La bibliografia mostra que *L. donovani*, *L. amazonensis* i *L. major* són les espècies més investigades (Ullah *et al.*, 2016).

En la taula 2 es resumeixen els resultats de la recerca centrada en estudis de fraccions i extractes de plantes *in vitro* en l'espècie *Leishmania infantum*. Tot seguit es comenten els aspectes més rellevants dels treballs recollits.

Primerament, s'observa que les parts de plantes més usades en els estudis són la fulla i, a continuació, la part aèria (la qual inclou la fulla).

Per altra banda, es pot observar que els principals dissolvents utilitzats per a l'extracció de productes de plantes són el metanol i el clorur de metilè.

Pel que fa a les condicions experimentals dels estudis, cal dir que la majoria s'han dut a terme sobre la forma promastigot del paràsit, mentre que la forma infecciosa del paràsit és l'amastigot. Sempre que sigui possible, els assajos s'haurien de realitzar en amastigots i en els macròfags com a principal mitjà d'experimentació, ja que és la cèl·lula que manté la forma infectiva del paràsit i, a més,

permet fer estudis per a la valoració de la toxicitat dels compostos. Tots els estudis s'han fet en les condicions de pH i temperatura adequades segons la forma del paràsit: els promastigots són actius a un pH aproximat de 7 i sobreviuen a una temperatura de 22-26 °C. En canvi, els amastigots tenen la capacitat de mantenir-se actius al pH àcid dels macròfags, es desenvolupen *in vitro* a un pH de 5,0-5,5 i a una temperatura de 32-34 °C (Ullah *et al.*, 2016).

L'interval utilitzat en tots els estudis es troba entre les 24 i les 72 hores. Un període llarg permet descartar altres factors que poden afectar l'estudi i donen veracitat a l'experiment.

Els fàrmacs de control dels estudis són els principals usats per al tractament de la leishmaniosi humana. En l'estudi realitzat per Coloma *et al.* (González-Coloma *et al.*, 2012) no s'indiquen els resultats obtinguts en el fàrmac de control, la qual cosa no permet avaluar adequadament els resultats.

Les concentracions dels extractes utilitzades presenten una variabilitat elevada, ja que van des d'1 µg/mL fins a 179 mg/mL.

La millor manera de valorar l'efectivitat d'un compost sobre el paràsit és valorar la IC₅₀, és a dir, la concentració de droga que causa el 50% de la inhibició del creixement de la forma amastigot o promastigot. Aquest paràmetre permet comparar diferents estudis sempre que s'hagin realitzat en les mateixes condicions i concentracions. Cal indicar que en l'estudi realitzat per Weniger *et al.* (Weniger *et al.*, 2001) es va valorar l'efectivitat avaluant el moviment de paràsits, la qual cosa implica certa subjectivitat en el resultat.

D'entre els extractes de plantes que presenten valors de IC₅₀ inferiors al fàrmac de referència cal destacar les espècies *Berberis vulgaris* L., *Nigella sativa* L., *Spondias mombin* L. i *Vitis vinifera* L.

En l'estudi realitzat per Mahmoudvand *et al.* (Mahmoudvand *et al.*, 2014), el component pur berberina aïllat de la part aèria de *Berberis vulgaris* L. és el que presenta una activitat més elevada. Els resultats de l'estudi mostren que la forma promastigot és més sensible a la substància que la forma amastigot. En l'estudi no es proposa cap mecanisme d'acció per a la berberina, però Vennerstrom *et al.* (Vennerstrom *et al.*, 2012) van demostrar que hi havia una disminució de la càrrega parasitària en el fetge i una disminució de la mida de les úlceres *in vivo* en hámsters infectats per *L. donovani* i *L. braziliensis*.

Pel que fa a l'estudi amb la part aèria de *Nigella sativa* L. (Mahmoudvand *et al.*, 2014), l'extracte metanòlic, l'oli essencial i el seu principal component, la timoquinona, mostren valors més baixos de IC₅₀ que el fàrmac de control. D'acord amb els autors, l'oli essencial de la part aèria de *N. Sativa* L. podria inhibir la síntesi de DNA del paràsit, a més d'estimular l'activitat fagocítica dels macròfags, però indiquen que calen estudis clínics per avaluar exactament la seva activitat biològica.

Accioly *et al.* (Accioly *et al.*, 2012) confirmen la presència de tanins, antraquinones, flavonoides, leucociadines i saponines en l'extracte aquós i metanòlic de la fulla de *Spondias mombin* L., els quals presenten una activitat més elevada que el fàrmac de control en la forma amastigot. L'extracció que va obtenir millors valors de IC₅₀ tant per a la forma promastigot com per a la forma amastigot va ser la realitzada amb etilacetat i metanol en una proporció 80:20.

En el cas dels extractes de fulla de *Vitis vinifera* L., els autors indiquen que l'extracte metanòlic té una concentració més elevada d'antocianines que l'extracte aquós, la qual cosa podria indicar una activitat més elevada en els promastigots de *L. infantum* (Mansour *et al.*, 2013).

En la taula 2 s'ha fet èmfasi en els extractes d'*Artemisia* spp. per tal de valorar la seva activitat *in vitro* en *L. infantum* i aprofundir-hi en la segona part del treball. En l'estudi més antic, realitzat per Martín *et al.* el 1998 (Martín *et al.*, 1998), es conclou que *Artemisia pedemontana* conté lactones sesquiterpèniques i flavonoides. Tabari *et al.* (Tabari i Youssefi, 2016) demostren en el seu estudi que les concentracions de 15 i 20 µg/mL d'oli essencial de la part aèria d'*Artemisia sieberi* són estadísticament significatives en la inhibició del creixement de *L. infantum*, però pel que fa al mecanisme d'acció indiquen que és desconegut. En l'estudi realitzat per Aloui *et al.* (Aloui *et al.*, 2016) *respectively. However, antioxidant effects of both essential oils, determined by ferric-reducing antioxidant power (FRAP* els autors ressalten l'activitat antioxidant dels olis essencials de la part aèria d'*Artemisia campestris* i *Artemisia herba-alba*, la qual podria afectar la viabilitat i la proliferació dels promastigots de *L. infantum*.

Cal indicar que la composició de cada gènere d'*Artemisia* és variable, la qual cosa podria afectar la seva activitat sobre *L. infantum*, però la bibliografia mostra que és una espècie que podria tenir certa activitat antiparasitària i és per això que més endavant s'aprofundeix en aquest aspecte.

TAULA 2. ESTUDIS DE L'ACTIVITAT DE PLANTES I EXTRACTES DE PLANTES REALITZATS IN VITRO EN LEISHMANIA INFANTUM.

Nom botànic i família	Part usada	Extracció/ fracció	Forma de <i>L. infantum</i> ^a	Resultats (µg/mL)	Control ^b	Resultats control (µg/mL)	Concentració Extracte µg/mL	Temps exposició (h)	Referència
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f. <i>Xanthorrhoeaceae</i>	Fulla	Acetat d'etil	P	IC ₅₀ = 1,49	PEN	IC ₅₀ = 0,17-23.11	6.25 -100	24	Rondon <i>et al.</i> (2011)
			A	IC ₅₀ = 1,04	AMF	IC ₅₀ = 0,05 - 51.87			
		Clorofòrmic	P	IC ₅₀ = 26,20	PEN	IC ₅₀ = 0,17-23.11			
			A	IC ₅₀ = 96,59	AMF	IC ₅₀ = 0,05 - 51.87			
		Metanòlic	P	IC ₅₀ = 1,54	PEN	IC ₅₀ = 0,17- 23.11			
			A	IC ₅₀ = 79,82	AMF	IC ₅₀ = 0,05 - 51.87			
<i>Artemisia campestris</i> L. <i>Asteraceae</i>	Part aèria	Oli essencial	P	IC ₅₀ = 44	AMF	IC ₅₀ = 0,03	No indicat	72	Aloui <i>et al.</i> (2016)
<i>Artemisia herba-alba</i> Asso <i>Asteraceae</i>	Part aèria	Oli essencial	P	IC ₅₀ = 68	AMF	IC ₅₀ = 0,03	No indicat	72	Aloui <i>et al.</i> (2016)
<i>Artemisia pedemontana</i> Balb. <i>Asteraceae</i>	Part aèria	Clorur de metil	P	LC ₁₀₀ = 100	PEN	LC ₁₀₀ = 5	25 - 500	72	Martin <i>et al.</i> (1998)
<i>Artemisia sieberi</i> Besser <i>Asteraceae</i>	Part aèria	Oli essencial	P	15 µg/mL: %IG = 66 20 µg/mL: %IG = 90	MEG	%IG=98	1-20	48	Tabari <i>et al.</i> (2016)
<i>Berberis vulgaris</i> L. <i>Berberidaceae</i>	Part aèria	Metanòlic	P	IC ₅₀ = 13,2	MEG	IC ₅₀ = 9,3	5 - 50	48	Mahmoud- vand <i>et al.</i> (2014)
			A	IC ₅₀ = 32,6	MEG	IC ₅₀ = 21,3			
		Aquós	P	IC ₅₀ = 21,6	MEG	IC ₅₀ = 9,3			
			A	IC ₅₀ = 52,8	MEG	IC ₅₀ = 21,3			
		Berberina	P	IC ₅₀ = 2,7	MEG	IC ₅₀ = 9,3			
			A	IC ₅₀ = 3,9	MEG	IC ₅₀ = 21,3			



Nom botànic i família	Part usada	Extracció/ fracció	Forma de L. infantum ^a	Resultats (µg/mL)	Control ^b	Resultats control (µg/mL)	Concentració Extracte µg/mL	Temps exposició (h)	Referència
<i>Bupleurum rigidum</i> L. Apiaceae	Fulla i tija	Hidroalcohòlic	P	LC ₁₀₀ = 50 LC ₁₀₀ = 50	PEN	LC ₁₀₀ = 5	25 - 500	72	Martin <i>et al.</i> (1998)
<i>Casearia sylvestris</i> Sw. Salicaceae	Fulla	Casearina A	P	IC ₅₀ = 6,34	PEN	IC ₅₀ = 0,22	0,1 - 100	48	Bou <i>et al.</i> (2014)
		Casearina G	P	IC ₅₀ = 9,48					
		Casearina J	P	IC ₅₀ = 4,45					
		Casearina B	P	IC ₅₀ = ,93					
<i>Cordia myxa</i> L. Boraginaceae	Fruit	Mucil·lag	P	IC ₅₀ = 35	MIL	IC ₅₀ = 0,9 - 17 µM?	0.6 - 179	72	Saki <i>et al.</i> (2015)
<i>Coriandrum sativum</i> L. Apiaceae	Llavor	Acetat d'etil	P	IC ₅₀ = 7,10	PEN	IC ₅₀ = 0,17-23,11	6.25 - 100	24	Rondon <i>et al.</i> (2011)
			A	IC ₅₀ = 27,33	AMF	IC ₅₀ = 0,05-51,87			
		Clorofòrmic	P	IC ₅₀ = 33,21	PEN	IC ₅₀ = 0,17-23,11			
			A	IC ₅₀ = 34,20	AMF	IC ₅₀ = 0,05-51,87			
		Metanòlic	P	IC ₅₀ = 3,18	PEN	IC ₅₀ = 0,17-23,11			
			A	IC ₅₀ = 0,57	AMF	IC ₅₀ = 0,05-51,87			
<i>Inula montana</i> L. Asteraceae	Part aèria	Clorur de metil	P	LC ₁₀₀ = 50	PEN	LC ₁₀₀ = 5	25 - 500	72	Martin <i>et al.</i> (1998)
<i>Morinda citrifolia</i> L. Rubiaceae	Fruit	Aquós	P	IC ₅₀ = 260,5	AMF	IC ₅₀ = 3,1	30 - 960	72	Almeida <i>et al.</i> (2016)
			A	IC ₅₀ = 201,3	AMF	IC ₅₀ = 0,9			
<i>Musa x paradisiaca</i> L. Musaceae	Fulla	Hexà:cloroform (50:50)	P	IC ₅₀ = 915,2	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99	6.25 - 100	No indicat	Accioly <i>et al.</i> (2012)
		Etilacetat:metanol (90:10)	A	IC ₅₀ = 15,07	AMF	IC ₅₀ = 408 - 219,20			
		Etilacetat:metanol (50:50)	P	IC ₅₀ = 1,83	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99			
			A	IC ₅₀ = 14,18	AMF	IC ₅₀ = 4,08 - 219,20			
		Etilacetat:metanol (50:50)	P	IC ₅₀ = 21,60	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99			
			A	IC ₅₀ = 95,31	AMF	IC ₅₀ = 4,08 - 219,20			
		Metanol 100%	P	IC ₅₀ = 1,70	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99			
			A	IC ₅₀ = 16,54	AMF	IC ₅₀ = 4,08 - 219,20			



Nom botànic i família	Part usada	Extracció/ fracció	Forma de <i>L. infantum</i> ^a	Resultats (µg/mL)	Control ^b	Resultats control (µg/mL)	Concentració Extracte µg/mL	Temps exposició (h)	Referència
<i>Nigella sativa</i> L. <i>Ranunculaceae</i>	Part aèria	Metanòlic	P	IC ₅₀ = 15,7	MEG	IC ₅₀ = 17,6	0 - 200	72	Mahmoud-vand et al. (2014)
			A	IC ₅₀ = 34,6	MEG	IC ₅₀ = 39,4			
		Oli essencial	P	IC ₅₀ = 11,7	MEG	IC ₅₀ = 17,6			
			A	IC ₅₀ = 26,3	MEG	IC ₅₀ = 39,4			
		Timoquinona	P	IC ₅₀ = 1,47	MEG	IC ₅₀ = 17,6			
			A	IC ₅₀ = 2,6	MEG	IC ₅₀ = 39,4			
<i>Protium amplum</i> Cuatrec. <i>Bursaraceae</i>	Fruit	Clorur de metilè	P	++ = Actiu	PEN	No indicat	10 - 100	72	Weniger et al. (2001)
<i>Ricinus communis</i> L. <i>Euphorbiaceae</i>	Fulla	Acetat d'etil	P	IC ₅₀ = 3,45	PEN	IC ₅₀ = 0,17 - 23,11	6.25 - 100	24	Rondon et al. (2011)
			A	IC ₅₀ = 17,28	AMF	IC ₅₀ = 0,05 - 51,87			
		Cloroformic	P	IC ₅₀ = 2,85	PEN	IC ₅₀ = 0,17 - 23,11			
			A	IC ₅₀ = 17,32	AMF	IC ₅₀ = 0,05 - 51,87			
		Metanòlic	P	IC ₅₀ = 11,12	PEN	IC ₅₀ = 0,17 - 23,11			
			A	IC ₅₀ = 146,60	AMF	IC ₅₀ = 0,05 - 51,87			
<i>Scrophularia scorodonia</i> L. <i>Scrophulariaceae</i>	Flor	Metanòlic	P	LC ₁₀₀ = 250	PEN	C = 5 µg/mL	25 - 500	72	Martin et al. (1998)
<i>Spondias mombin</i> L. <i>Anacardiaceae</i>	Fulla	Cloroform:etilacetat (80:20)	P	IC ₅₀ = 246,10	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99	6.25 - 100	No indicat	Accioly et al. (2012)
			A	IC ₅₀ = 17,07	AMF	IC ₅₀ = 4,08 - 219,20			
		Etilacetat:cloroform (90:10)	P	IC ₅₀ = 253,6	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99			
			A	IC ₅₀ = 0,61	AMF	IC ₅₀ = 4,08 - 219,20			
		Etilacetat:metanol (80:20)	P	IC ₅₀ = 11,26	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99			
			A	IC ₅₀ = 0,27	AMF	IC ₅₀ = 4,08 - 219,20			
		Metanol 100%	P	IC ₅₀ = 58,10	PEN	IC ₅₀ = 0,29 - 52,99			
			A	IC ₅₀ = 42,16	AMF	IC ₅₀ = 4,08 - 219,20			



Nom botànic i família	Part usada	Extracció/ fracció	Forma de <i>L. infantum</i> ^a	Resultats (µg/mL)	Control ^b	Resultats control (µg/mL)	Concentració Extracte µg/mL	Temps exposició (h)	Referència
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) G. Nicholson <i>Bignoniaceae</i>	Escorça	Hexà	P	%IG = 100	AMF	No indicat	100 - 800	48	González-Coloma <i>et al.</i> (2011)
		Cloroformic	P	%IG = 100					
		Hidroalcohòlic	P	%IG = 1,5					
<i>Thymus capitellatus</i> Hoffmanns. & Link <i>Lamiaceae</i>	Part aèria	Oli essencial	P	IC ₅₀ = 37	MIL	0,032 – 0,25	10-400	24	Machado <i>et al.</i> (2014)
<i>Vitis vinifera</i> L. <i>Vitaceae</i>	Fulla	Aquós	P	IC ₅₀ = 12,53	MEG	IC ₅₀ = 8,50	6,25-50	72	Mansour <i>et al.</i> (2013)
		Etanòlic	P	IC ₅₀ = 0,11	MEG	IC ₅₀ = 8,50L	0,001 - 1	72	
<i>Zamia ulei</i> Dammer <i>Zamiaceae</i>	Tubercle	Hexà	P	%IG = 84,7	AMF	No indicat	100 - 800	48	González-Coloma <i>et al.</i> (2011)
		Cloroformic		%IG = 93,3					
		Hidroalcohòlic		%IG = 0					

^aP: promastigots; A: amastigots.

^bAMF: amfotericina B; KET: ketoconazol; MEG: antimoniat de meglumina MIL: miltefosina; PEN: pentamidina.

4.2.2. Estudis *in vivo*

Després de l'anàlisi realitzada en els estudis *in vitro* es va procedir a la recerca d'estudis realitzats *in vivo* en gossos infectats per *L. infantum*. En aquest cas, els resultats obtinguts van ser molt més limitats, ja que la major part de la bibliografia es basa en assajos clínics en humans i, per tant, en les espècies de *Leishmania* que l'afecten. A continuació es presenten els estudis que s'han considerat més rellevants per a l'ús de la fitoteràpia en gossos.

4.2.2.1. Novel Herbal Immunomodulator Drug (IMOD)

En l'estudi realitzat per Malmasi *et al.* (Malmasi *et al.*, 2014) es va determinar l'eficàcia i la seguretat de l'IMOD, un producte a base dels extractes etanòlics de fruits dessecats de *Rosa canina* L. i de les fulles i tiges dessecades d'*Urtica dioica* L. i *Tanacetum vulgare* L., que també porta seleni afegit. Per cada litre de l'extracte final combinat s'afegeixen 16 mg de seleni i amb això es realitza una filtració esterilitzant del producte (Novitsky *et al.*, 2007).

En l'estudi de Novitsky *et al.* (Novitsky *et al.*, 2007), l'IMOD presenta potencial com a immunomodulador en pacients amb VIH, en els quals els autors observen disminució de l'estrès oxidatiu, reducció del factor d'activitat de necrosi tumoral i millora dels limfòcits T col·laboradors (*helper*). Segons els autors, l'IMOD presenta efectivitat en models experimentals de malalties basades en immuno-inflamació i reducció de la taxa de mortalitat en pacients d'unitats de cures intensives sense efectes mutagènics ni genotòxics.

En l'estudi realitzat per Malmasi *et al.* (Malmasi *et al.*, 2014) es van utilitzar vint gossos sans d'entre un i quatre anys, setze dels quals van ser infectat per via intravenosa amb un cultiu de *Leishmania infantum* procedent de la melsa d'un gos infectat. Els gossos es van dividir aleatòriament en cinc grups: a) grup I: control negatiu, gossos no infectats; b) grup II: tractament amb meglumina antimoniat (Glucantime®), 100 mg/kg/dia durant 30 dies; c) grup III: tractament amb Glucantime®, la mateixa dosi que el grup II, i infusió intravenosa d'IMOD, dosi de 2 mg/kg amb 100 mL DW (*Dextrosa in water*) 5% durant 1 hora, cada dia durant un mes; d) grup IV: infusió d'IMOD, mateixa dosi que el grup III; e) grup V: control positiu, solució salina fisiològica en gossos infectats.

Els animals van ser monitoritzats regularment amb una exploració clínica, hematologia i serologia els dies 30, 60, 90 i 120 després de la inoculació.

Els principals símptomes postinoculació que van presentar els animals van ser pèrdua de pes, limfadenopatia, pneumònia i letargia.

Resultats: En l'estudi s'observa que en el grup II, tractat amb Glucantime®, alguns signes clínics com la pneumònia desapareixen 60 dies després de l'inici del tractament. Les altres manifestacions, com la limfadenopatia, la letargia i les lesions a la pell, van reaparèixer 30 dies després del tractament. Es va detectar una reducció del títol d'anticossos anti-*Leishmania* 60 dies després del tractament, però cap dels gossos no va presentar seronegativitat.

En el grup III (Glucantime® + IMOD) es va observar la remissió dels signes clínics 30 dies després del tractament. Els valors de l'hematologia i la bioquímica van ser normals i es va observar també la disminució d'anticossos anti-*Leishmania*, tot i que els animals no van presentar seronegativitat. En aquest grup, els animals van mostrar millors condicions clíniques i una disminució significativa de la mida de la melsa en comparació amb el grup II.

En el grup IV, en el qual es va administrar només IMOD, no es van observar efectes adversos i l'avaluació hematològica i bioquímica dels gossos va ser normal. Només es va observar una disminució de la mida de la melsa després d'un període curt de teràpia. Els autors creuen que aquest fet podria estar associat a la disminució de la càrrega parasitària. No obstant això, després de l'avaluació

parasitològica i per PCR, conclouen que en l'estudi realitzat l'IMOD no té efecte en l'eliminació del paràsit.

El nombre d'animals utilitzat per a cada grup no és suficient per fer una anàlisi estadística significativa, però, d'acord amb els autors, l'IMOD podria ser un adjuvant important en el protocol anti-*leishmania*.

4.2.2.2. (-)- α -Bisabolol

(-)- α -bisabolol ((-)-6-metil-2-(-4-metil-3-ciclohexen-1-il)5-hepten-2-ol)) és un alcohol sesquiterpènic monocíclic insaturat i principi actiu d'olis essencials de diverses plantes, com ara *Matricaria chamomilla* L. o *Tanacetum balsamita* L. Té múltiples activitats biològiques i beneficis terapèutics descrits, com la seva activitat antinociceptiva, antioxidant, microbicides, antineoplàstica i antiparasitària (Vanaclocha i Cañigual, 2019).

En la tesi doctoral de Corpas (Corpas López, 2015) s'utilitza aquest component en diferents assajos *in vivo*. En tots ells es dissol en dimetilsulfòxid (DMSO) fins a obtenir la concentració desitjada i es barreja amb oli d'oliva per poder ser administrat per via oral.

- Primerament s'avalua l'efectivitat de l'(-)- α -bisabolol en ratolins infectats experimentalment amb *L. infantum*. En l'estudi es fan sis grups de set ratolins cadascun i es tracten durant 14 dies de la manera següent:
- Grup de control (AO): 0,5 mL d'oli d'oliva per via oral
- Grup B50: 50 mg/kg de (-)- α -bisabolol diluïts en oli d'oliva (volum final (VF) de 0,5 mL)
- Grup B200: 200 mg/kg de (-)- α -bisabolol diluïts en oli d'oliva (VF de 0,5 mL)
- Grup B1000: 1.000 mg/kg de (-)- α -bisabolol diluïts en oli d'oliva (VF de 0,5 mL)
- Grup de control de referència (G): 104 mg/kg d'antimoni de meglumina (AM) per via intraperitoneal
- Grup de combinació (BG): 104 mg/kg de AM per via intraperitoneal i 200 mg/kg de (-)- α -bisabolol diluïts en oli d'oliva (VF de 0,5 mL)

Resultats: En l'assaig es conclou que l'òrgan més parasitat va ser la melsa, amb unes càrregues parasitàries fins a deu vegades superiors a les del fetge. En la melsa, el tractament amb (-)- α -bisabolol va ser eficaç a una dosi de 50 mg/kg, que va reduir la càrrega parasitària un 56%, la de 200 mg/kg va reduir-la un 72% i la de 1.000 mg/kg, un 53%. En aquest cas, el tractament amb el producte de referència no va ser eficaç en aquest òrgan ($p > 0,1$), ni tampoc la combinació entre aquest i l'(-)- α -bisabolol.

En el fetge, l'(-)- α -bisabolol va ser eficaç a una dosi de 50 mg/kg (83% de reducció de la càrrega parasitària) i a 200 mg/kg (89%). Tot i així, no va mostrar diferències estadísticament significatives respecte al control sense tractament a la dosi més elevada, de 1.000 mg/kg. El tractament amb AM va mostrar l'efectivitat habitual en aquest òrgan i va reduir un 89% la càrrega parasitària. El tractament combinat d'(-)- α -bisabolol i AM va ser molt eficaç ($p < 0,01$), atès que va reduir un 99,5% la parasitació del fetge, i va superar en eficàcia el tractament amb producte antimonial en monoteràpia. Pel que fa a la toxicitat, les dosis de 50 mg/kg i 200 mg/kg no van produir alteracions dels paràmetres bioquímics, però en la dosi de 1.000 mg/kg es van observar alteracions dels paràmetres hepàtics, la qual cosa podria indicar hepatotoxicitat, segons l'autor.

Posteriorment es va fer l'avaluació d' (-)- α -bisabolol *in vivo*, per a la qual cosa es va administrar per via oral en el tractament de la leishmaniosi canina adquirida de manera natural. Per a aquest estudi es van utilitzar quatre gossos. El tractament es va considerar eficaç en dos d'ells, ja que va disminuir la càrrega parasitària a la medul·la òssia un 73% i un 100%, i va descendir també a la sang i al gangli popliti, mentre que en el tercer gos les càrregues parasitàries a la medul·la i al gangli van aug-

mentar en l'anàlisi del dia 120. En el quart gos no es va trobar el paràsit a la medul·la òssia al principi de l'experiment, però la càrrega parasitària va disminuir tant a la sang com al gangli popliti. L'autor també va valorar la resposta immunològica, la qual va mostrar molt poca variació entre abans i després del tractament. L'estat clínic va millorar en tots els gossos, especialment en aquells en què el tractament va ser eficaç.

4.2.2.3. *Artemisia annua* L.

Artemisia annua L. és una planta de la família de les asteràcies que ha estat usada durant més de dos mil anys en la medicina tradicional xinesa com a antipirètic (Mesa *et al.*, 2017). Les espècies del gènere *Artemisia* han estat usades també en la medicina oriental per al tractament de la malària, les helmintiasis intestinals, la diarrea i com a sedant (Shahbazfar *et al.*, 2012). Hi ha diversos estudis que demostren l'efectivitat d'*Artemisia annua* L. en el tractament de la leishmaniosi, però pel que fa a *Leishmania infantum* la bibliografia és molt limitada. El 2016 Rosa Tejada va publicar un article en què es presenten quatre casos clínics de gossos amb leishmaniosi tractats amb extracte de fulla d'*Artemisia annua* L. a la seva clínica veterinària (Tejada, 2016). Els resultats de la recerca de tota la bibliografia relacionada amb *Artemisia annua* L. i la leishmaniosi es presenten a la taula 3 i a continuació es comenten els resultats classificats per espècie de *Leishmania*.

a) Estudis en *Leishmania infantum*

El resultat de la recerca basada en *Artemisia annua* L. i *Leishmania infantum* demostra que no hi ha estudis *in vitro* per valorar la seva activitat en aquesta espècie. Tal com s'ha comentat, pel que fa als estudis realitzats *in vivo* en gossos infectats per *Leishmania infantum* destaca el treball realitzat per Rosa Tejada (Tejada, 2016), en el qual es presenten quatre casos clínics de gossos amb leishmaniosi tractats amb preparats a base d'*Artemisia annua* L. com a tractament complementari o únic. En tots els casos s'administra 1 g/10kg d'extracte o pols de fulla seca dos cops per dia, fora dels àpats, en tantes de 9 dies i intervals de descans de 7 dies. En l'estudi es fa el seguiment terapèutic dels pacients un mes i tres mesos després de començar el tractament, amb una analítica completa, proteïnograma i, en alguns casos, PCR quantitativa de melsa.

Resultats: Segons l'autora, en els quatre casos es van evidenciar millores clíniques en les proves de laboratori i en els animals, i cap d'ells no va presentar recaigudes. Cal destacar que en un d'ells es va fer una PCR per aspiració en la melsa i el resultat va ser de 52.954 paràsits/mL en la punció abans del tractament, mentre que tres mesos després de l'inici del tractament amb *A. annua* L. la PCR va donar un valor de 12 paràsits/mL en la punció. En dos dels quatre animals es va observar disminució de la ràtio de *Leishmania*.

En cap d'ells es van observar variacions en els paràmetres hepàtics i renals.

TAULA 3. ESTUDIS REALITZATS AMB PREPARATS D'ARTEMISIA ANNUA L. EN DIFERENTS ESPÈCIES DE LEISHMANIA.

Preparat	Estudi	Animal	Espècie de <i>Leishmania</i>	Forma ^a	Resultats µg/mL	Control	Resultats control µg/mL	Concentració/tractament	Autor
Extracte de fulles	<i>In vivo</i>	Gossos	<i>L. infantum</i>	-	Millores analítiques i absència de recaigudes	-	-	1 mg/10kg durant 10 dies i 7 dies descans	Tejada 2016
Extracte n-hexànic de fulles (AAL) i llavors (AAS)	<i>In vitro</i>	-	<i>L. donovani</i>	P	AAL: IC ₅₀ = 14,4 AAS: IC ₅₀ = 14,6	PEN	IC ₅₀ = 1.1	100 µg/mL	Islammudin <i>et al.</i> 2012
		-		A	AAL: IC ₅₀ = 6,6 AAS: IC ₅₀ = 5,05	PEN	IC ₅₀ = 1	0 - 100 µg/mL	
	<i>In vivo</i>	BALB/c mica	<i>L. donovani</i>	-	AAL: RP = 48,84% AAS: RP = 45,35%	AMF	RP = 52,33%	200 mg/kg	Islammudin <i>et al.</i> 2015
Oli essencial de fulles	<i>In vitro</i>	-	<i>L. donovani</i>	P	IC ₅₀ = 14,63	PEN	IC ₅₀ = 1,23	0,41 - 100 µg/mL	Islammudin <i>et al.</i> 2014
	<i>In vitro</i>	-		A	IC ₅₀ = 7,3	PEN	IC ₅₀ = 1,16 L	0 - 100 µg/mL	
	<i>In vivo</i>	BALB/c mica		-	RP Fetge = 88,68% ^b RP Melsa = 91,66% ^b	AMF	RP fetge 94,02% ^b RP melsa = 98,09% ^b	50 - 200 mg/kg	
Pols de fulles	<i>In vitro</i>	-	<i>L. (Viannia) panamensis</i>	A	IC ₅₀ = 48,07 IC ₉₀ = 82,2	AMF	IC ₅₀ = 0,06 IC ₉₀ = 0,1	6,25 - 200 µg/mL	Mesa <i>et al.</i> 2017
	<i>In vivo</i>	Hàmsters		-	Reepitelització de lesions cutànies	MEG	Reepitelització de lesions cutànies	500 mg/kg/dia durant 30 dies	
	<i>In vivo</i>	Persones		-	Tancament d'úlceres	-	-	30 g/dia durant 20 dies	

^aP: promastigots; A: amastigots.

^bRP: reducció parasitària a una concentració de 200 mg/kg d'oli essencial d'*A. annua* L.

b) Estudis en *Leishmania donovani*

Islamuddin *et al.* van demostrar el 2014 que l'oli essencial obtingut de fulles d'*Artemisia annua* L. té una activitat significativa contra *Leishmania donovani* (Islamuddin *et al.*, 2014). En els estudis *in vitro* es va obtenir una IC_{50} de 14,63 $\mu\text{g/mL}$ en els promastigots i una IC_{50} de 7,3 $\mu\text{g/mL}$ en els amastigots. Els autors van realitzar també un estudi *in vivo* en ratolins, en els quals es va observar una reducció parasitària similar a l'aconseguida amb el fàrmac de control.

Pel que fa al mecanisme d'acció d'aquest oli essencial, els autors proposen un model basat en la mort cel·lular programada (*Programmed cell death, PCD*), en el qual participen l'externalització de fosfatidilserina, la reducció del potencial de membrana, la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la producció d'òxid nítric (NO), que comporten l'activació d'endonucleases, les quals provoquen una fragmentació del DNA i una pèrdua de kDNA mitocondrial del paràsit.

Aquest efecte es va demostrar *in vitro* i *in vivo* en *Leishmania donovani* en l'estudi realitzat també per Islamuddin *et al.* el 2012 (Islamuddin *et al.*, 2012), en el qual es va valorar l'activitat de l'extracte n-hexànic de fulles (AAL) i llavors (AAS). Per obtenir-lo es va extreure pols de fulles i llavors amb solvents de polaritat creixent: n-hexà, etanol i aigua. El residu de l'extracció amb n-hexà es va assecat i es va extreure successivament amb etanol i aigua, i posteriorment es va dessecar i concentrar. Els resultats de l'activitat d'aquest extracte n-hexànic obtingut van ser una IC_{50} de 14,4 i 14,6 $\mu\text{g/mL}$ per a la fulla i la llavor respectivament en els promastigots, i una IC_{50} de 6,6 i 5,05 $\mu\text{g/mL}$ per a la fulla i la llavor respectivament en els amastigots intracel·lulars.

Posteriorment, es van estudiar l'eficàcia terapèutica i el mecanisme immunoestimulador per a aquests dos preparats *in vivo* en ratolins (Islamuddin *et al.*, 2015). Segons els autors, el tractament de ratolins infectats per *L. donovani* i tractats amb AAL i AAS disminueix la càrrega parasitària i esplènica i comporta una reducció de la mida de la melsa. AAL i AAS causen un increment de la producció de citoquines Th1 (IFN- γ) i, alhora, una disminució de les citoquines Th2 (IL-4 i IL-10). La potenciació de la via Th1 s'evidencia també en les cèl·lules B produint nivells més elevats de IgG2 que de IgG1. AAL i AAS també comporten un augment del nombre de cèl·lules T CD4+ i TCD8+, limfoproliferació, autoregulació de la coestimulació de molècules (CD80 i CD86) en les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) i generació de NO. D'acord amb els autors, la cura i la resistència a la infecció de *L. donovani* es deuen a la mort parasitària causada per AAL i AAS, la qual està mediada per als efectes immuno-potenciadors variant la proporció Th1/Th2 a favor de l'hoste i amb la inducció de la immunitat mediada per cèl·lules.

c) Estudis en *Leishmania (Viannia) panamensis*

Mesa *et al.* (Mesa *et al.*, 2017) també van fer diverses valoracions amb càpsules d'*Artemisia annua* L. en *Leishmania (Viannia) panamensis*. Aquestes càpsules es van preparar polvoritzant fulles senceres d'*A. annua* L. (80% fulles i 20% branques primes).

Primerament es va valorar l'activitat anti-leishmania *in vitro* en macròfags infectats per amastigots intracel·lulars de *L. (Viannia) panamensis* i es va concloure que la pols de fulles d'*Artemisia annua* L. presenta una activitat moderada amb valors de IC_{50} i IC_{90} de 48,07 $\mu\text{g/mL}$ i 82,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivament (considerant IC_{50} i IC_{90} com les concentracions d'*A. annua* L. en pols de fulla que comporten un 50% i un 90% d'inhibició de la infecció parasitària, respectivament). En l'estudi es considera que els valors de IC_{50} inferiors a 25 $\mu\text{g/mL}$ indiquen activitat anti-leishmania, valors de IC_{50} entre 25 i 50 $\mu\text{g/mL}$ indiquen activitat moderada i valors inferiors a 50 $\mu\text{g/mL}$ indiquen absència d'activitat anti-leishmania. El control amb amfotericina B va presentar una activitat més elevada en amastigots intracel·lulars de *L. (V) panamensis*, amb valors de IC_{50} i IC_{90} de 0,06 i 0,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivament.

Tot seguit es va valorar la resposta terapèutica i la toxicitat d'*Artemisia annua* L. en pols de fulles en sis hámsters amb leishmaniosi cutània experimental, tenint en compte l'evolució de les lesions després del tractament en comparació amb el tractament amb meglumina antimoniat (MA) i

sense tractament. Els hàmmsters van ser tractats durant 30 dies amb una dosi de 500 mg/kg/dia i cinc d'ells van curar-se, entenent com a cura la resolució de la infecció amb reepitelització completa de les lesions cutànies. En el cas del tractament amb MA, tots els animals van ser curats i en cap d'ells no es van detectar paràsits vius. Pel que fa al grup dels no tractats, cap d'ells va ser curat durant el període d'estudi.

Cap dels animals en els grups de tractament va experimentar pèrdua de pes. Al contrari, es va observar un guany de pes en tots els hàmmsters, per la qual cosa els autors suggereixen que no es van produir efectes tòxics en els hàmmsters tractats amb *A. annua* L.

A nivell de laboratori, es van observar nivells similars de nitrogen ureic (*Blood Urea Nitrogen*, BUN) i alanina-transaminasa (*Alanine Transaminase*, ALT) entre el grup de hàmmsters no infectats i els infectats i no tractats. En canvi, el tractament amb MA va incrementar els nivells d'ALT a nivell hepàtic.

En el mateix estudi també es va valorar la resposta de la pols de fulles d'*Artemisia annua* L. en dos pacients amb leishmaniosi cutània no complicada. En aquest cas, els pacients van ser tractats amb un total de 30 g per dia de pols de fulles d'*A. annua* L. durant 20 dies. Al final del tractament, les úlceres es van reduir aproximadament un 20-35%. En els dos pacients la cura completa es va observar el dia 45 després d'acabar el tractament (100% de tancament de l'úlcer i presència de cicatriu en el lloc de la lesió). A més, els dos pacients no van patir efectes adversos.

Mesa *et al.* (Mesa *et al.*, 2017) conclouen que els resultats de l'assaig biològic demostren que l'administració d'*Artemisia annua* L. en pols de fulla és fàcil i aparentment segura i eficaç, i podria servir com una opció per al tractament de la leishmaniosi cutània no complicada. Recalquen que, encara que són necessaris més estudis, s'observa que la resposta terapèutica a aquest producte herbari es podria millorar augmentant la dosi o la freqüència d'administració. D'acord amb els autors, l'efectivitat i la seguretat potencial d'*A. annua* L. en pols de fulles observades en l'estudi poden servir com a evidència fonamental per considerar aquest producte com una alternativa per al tractament de la leishmaniosi cutània i representen una oportunitat per a futures formulacions de productes fitoteràpics en el tractament de la leishmaniosi cutània.

Després d'observar els estudis realitzats amb diferents preparats d'*Artemisia annua* L. es pot concloure que tots tenen activitat sobre *Leishmania infantum*, encara que presenten valors de IC₅₀ superiors al fàrmac de control.

Segons els resultats observats, el preparat que té una activitat més elevada sobre la forma amastigot és la fracció n-hexà de les llavors, seguida de la fracció n-hexà de les fulles, amb valors molt propers a la IC₅₀ de l'oli essencial d'*A. annua* L.

Pel que fa als estudis *in vivo*, tots presenten resultats positius, atès que l'estat clínic de l'animal millora en tots els casos. Cal ressaltar la reducció parasitària que va presentar l'oli essencial d'*A. annua* L., amb valors similars als del fàrmac de control.

La recerca realitzada demostra que *Artemisia annua* L. té activitat sobre diferents espècies de *Leishmania* i si es valoren els diferents mecanismes d'acció proposats pels autors, podria tenir efectes positius en el tractament de la leishmaniosi canina. Tot i així, calen estudis *in vivo* en gossos per demostrar el seu efecte.

4.3. Cas clínic: ús d'*Artemisia annua* L. en Leishmaniosi Canina

Després de consultar la bibliografia sobre leishmaniosi i *Artemisia annua* L. i a causa de la meua feina com a veterinària al Centre Veterinari Moià, he tingut l'oportunitat de fer el seguiment d'un cas de leishmaniosi canina en el qual es va utilitzar un preparat d'*Artemisia annua* L. per al seu tractament. El cas s'exposa a continuació.

La Neula és una gossa de nou anys que va ser diagnosticada de leishmaniosi el desembre del 2017. L'animal presentava bàsicament símptomes cutanis recurrents i després de descartar altres causes se li va fer l'analítica per al diagnòstic de leishmaniosi. En la serologia van sortir uns valors molt elevats (> 1/1.280, seropositiu molt alt) i una ràtio *Leishmania* de 2,66, també elevada, per la

qual cosa es va decidir seguir el protocol habitual per a la leishmaniosi tractant la gossa amb antimoni de meglumina per via subcutània amb una dosi de 100 mg/kg/24h durant 30 dies i al·lopurinol per via oral amb una dosi de 10 mg/kg/12h durant 6 mesos. La gossa va respondre bé al tractament i no va presentar efectes secundaris greus, excepte polidípsia.

Al cap de mig any (agost 2018) es va fer una analítica de control i la ràtio de *Leishmania* havia disminuït, però l'animal continuava sent seropositiu molt alt. En aquest moment i atesa la predisposició dels propietaris, se'ls va proposar introduir en la pauta terapèutica un preparat d'*Artemisia annua* L. seguint el protocol descrit per Rosa Tejada (1 g/10 kg durant 9 dies i 9 dies de descans). Es va fer certa variació del protocol per tal de facilitar la pauta terapèutica als propietaris. El preparat en qüestió consisteix en càpsules d'extracte sec purificat de fulles d'*Artemisia annua* L. amb una relació droga-extracte 30:1.

Quatre mesos més tard (desembre 2018) la ràtio de *Leishmania* havia disminuït a 1,37 i la serologia indicava que l'animal tan sols era seropositiu, per la qual cosa es va optar per retirar l'al·lopurinol i usar el preparat d'*Artemisia annua* L. com a monoteràpia.

A l'abril del 2019 es va tornar a fer l'analítica i la ràtio havia augmentat a 1,55 i l'animal passava a ser seropositiu alt, per la qual cosa es va decidir introduir de nou l'al·lopurinol i fer la revaloració al cap de sis mesos. En la taula 4 es presenten els tractaments utilitzats al llarg d'aquest període i els resultats obtinguts en les serologies.

TAULA 4. TRACTAMENTS UTILITZATS I RESULTATS DE LABORATORI DE LA RÀTIO DE LEISHMANIA I DE LA SEROLOGIA DE LA NEULA.

	Ràtio de <i>Leishmania</i>	Anticossos Anti- <i>Leishmania</i>	Seropositivitat
Desembre 2017	2,66	> 1/1.280	Seropositiu molt alt
Tractament	Antimoni de meglumina + al·lopurinol		
Agost 2018	2,01	> 1/640	Seropositiu molt alt
Tractament	<i>Artemisia annua</i> L. + al·lopurinol		
Desembre 2018	1,37	1/320	Seropositiu
Tractament	<i>Artemisia annua</i> L.		
Abril 2019	1,55	1/640	Seropositiu alt
Tractament	<i>Artemisia annua</i> L. + al·lopurinol		

Veient els resultats obtinguts, sembla que les càpsules d'extracte sec purificat de fulles d'*Artemisia annua* L. amb una relació droga-extracte 30:1 presenten un efecte positiu en el tractament de la leishmaniosi canina. Encara que són necessaris assajos clínics en gossos per confirmar l'evidència, la Neula no ha presentat recaigudes fins avui i el tractament utilitzat no ha mostrat efectes adversos ni toxicitat per a l'animal.

5. Conclusions

- La leishmaniosi canina representa un problema veterinari i de salut pública àmpliament distribuït a la conca mediterrània. Els tractaments actuals presenten certs inconvenients, com ara la durada, la toxicitat, el cost i la resistència als fàrmacs, la qual cosa fa necessària la recerca de noves teràpies per a l'enfocament de la malaltia.

- Al llarg de la història s'han utilitzat moltes plantes medicinals per al tractament de la leishmaniosi. La fitoteràpia obre un ventall de possibilitats en la recerca de drogues que podrien usar-se en el tractament de la malaltia.
- Per tal de valorar l'activitat d'extractes de plantes sobre diferents espècies de *Leishmania* són necessaris primerament estudis *in vitro* en la forma amastigot del paràsit que permetin obtenir la IC₅₀ i valorar si s'obtenen resultats rellevants per a estudis *in vivo* posteriors.
- Hi ha diferents preparats vegetals que han demostrat efectivitat en el tractament de la leishmaniosi canina *in vivo*, els quals es podrien tenir en compte com a coadjuvants en el tractament de la leishmaniosi i podrien presentar menys efectes adversos que els tractaments actuals. Calen més assajos clínics en gossos per tal de confirmar l'evidència.
- Diversos preparats d'*Artemisia annua* L. han mostrat activitat sobre diferents espècies de *Leishmania*, la qual cosa la fa una espècie prometedora en el tractament de la leishmaniosi canina. Calen més estudis *in vitro* per confirmar el seu mecanisme d'acció i més estudis *in vivo* en un nombre elevat d'animals per valorar la seva eficàcia.
- En la clínica veterinària s'observa poc coneixement per receptar productes de plantes. En tots els casos és necessari especificar quin tipus de producte de fitoteràpia s'utilitza, ja que cada producte s'obté d'una part i una espècie concreta de planta i mitjançant una extracció específica, la qual cosa fa variar la seva concentració i, per tant, la seva efectivitat.

6. Bibliografia

- ACCIOLY, M.P. *et al.* (2012) «Leishmanicidal activity in vitro of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions». *Veterinary Parasitology* (Elsevier B.V.), 187(1-2), pp. 79-84. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.029.
- ALIAGA L, COBO F, MEDIAVILLA JD, *et al.* (2003) Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)*. 82(3):147-158. doi:10.1097/01.md.0000076009.64510.b8
- ALMEIDA-SOUSA, F. *et al.* (2016) «Ultrastructural Changes and Death of *Leishmania infantum* Promastigotes Induced by *Morinda citrifolia* Linn. Fruit (Noni) Juice Treatment». *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-10. doi: 10.1155/2016/5063540.
- ALOUI, Z. *et al.* (2016) «Asteraceae *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes». *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, p. 9147096. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2016/9147096.
- BANETH, G. *et al.* (2008) «Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one». *Trends in Parasitology*, 24(7), pp. 324-330. doi: 10.1016/j.pt.2008.04.001.
- BOU, D. *et al.* (2014) «Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane». *Phytomedicine* (Elsevier GmbH.), 21(5), pp. 676-681. doi: 10.1016/j.phymed.2014.01.004.
- CORPAS LÓPEZ, V. Nuevas perspectivas en el tratamiento de la Leishmaniosis: Evaluación de derivados hidroxámicos y (-)- α -bisabolol. Granada: Universidad de Granada, 2016. [http://hdl.handle.net/10481/42208]
- González-Coloma, A. *et al.* (2012) «Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants». *Parasitology Research*, 110(4), pp. 1381-1392. doi: 10.1007/s00436-011-2638-3.
- ISLAMUDDIN, M. *et al.* (2012) «Extracts of *Artemisia annua* leaves and seeds mediate programmed cell death in *Leishmania donovani*». *Journal of Medical Microbiology*, 61(PART12), pp. 1709-1718. doi: 10.1099/jmm.0.049387-0.
- ISLAMUDDIN, M. *et al.* (2014) «Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis». *Frontiers in Microbiology*, 5 (nov.), pp. 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2014.00626.
- ISLAMUDDIN, M. *et al.* (2015) «Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis». *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pntd.0003321.

- KOUTINAS, A.F., KOUTINAS, C.K. (2014) «Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi». *Veterinary Pathology*, 51(2), pp. 527-538. doi: 10.1177/0300985814521248.
- MACHADO, M. *et al.* (2014) «Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species». *Veterinary Parasitology* (Elsevier B.V.), 200(1-2), pp. 39-49. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.016.
- MAHMOUDVAND, H., SHARIFIFAR, F. *et al.* (2014) «In vitro inhibitory effect of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and its main component, Berberine against different leishmania species». *Iranian Journal of Parasitology*, 9(1), pp. 28-36.
- MAHMOUDVAND, H., MINAIE, K. *et al.* (2014) «Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone». *Pharmaceutical Biology*, 53(7), pp. 1052-1057. doi: 10.3109/13880209.2014.957784.
- MALMASI, A. *et al.* (2014) «Evaluation of a novel herbal immunomodulator drug (IMOD) in treatment of experimental canine visceral leishmaniasis». *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), pp. 1357-1367.
- MANSOUR R, HAOUAS N, BEN KAHLA-NAKBI A, *et al.* The Effect of *Vitis vinifera* L. Leaves Extract on *Leishmania infantum*. *Iran J Pharm Res.* 2013;12(3):349-355. .
- MARTÍN, T. *et al.* (1998) «Screening for Protozoocidal Activity of Spanish Plants». *Pharmaceutical Biology*, 36(1), pp. 56-62. doi: 10.1076/phbi.36.1.56.4627.
- MESA, L.E. *et al.* (2017) «In vitro and in vivo antileishmanial activity of *Artemisia annua* L. Leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans». *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(1), pp. 52-60. doi: 10.1590/0037-8682-0457-2016.
- NOVITSKY, Y.A., MADANI, H., GHARIBDOUST, F., FARHADI, M.F.B., M. M. (2007) «Use of a combination of ethanolic *Rosa* SP. *Urtica Dioica* and *Tanacetum Vulgare* extracts, further comprising selenium and urea and having been exposed to a pulsed electromagnetic field, for the preparation of a medicament for immunostimulation and/or treat». *EU Patent*, 1(19).
- Organització Mundial de la Salut (2018) "Leishmaniasis" Nota descriptiva de la OMS. *Ginebra*. Disponible a: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/ (accedit: febrer 2019)
- REGUERA, R.M. *et al.* (2016) «Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis». *Veterinary Parasitology*, 227, pp. 98-114. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.07.011.
- RIBEIRO, R. *et al.* (2018) «Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control». *BioMed Research International*, 2018. doi: 10.1155/2018/3296893.
- RODRIGUES, I.A. *et al.* (2015) «Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response». *Mediators of Inflammation*, 2015, pp. 1-12. doi: 10.1155/2015/835910.
- RONDON, F. *et al.* (2011) «In vitro effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells». *Veterinary Parasitology* (Elsevier B.V.), 178(3-4), pp. 235-240. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.007.
- SAKI, J. *et al.* (2015) «In Vitro Activity of *Cordia myxa* Mucilage Extract Against *Leishmania major* and *L. infantum* Promastigotes». *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), pp. 16-18. doi: 10.5812/jjm.19640.
- SHAHBAZFAR, A.A. *et al.* (2012) «Effects of different concentrations of artemisinin and artemisinin-iron combination treatment on Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells». *Interdisciplinary Toxicology*, 5(1), pp. 30-37. doi: 10.2478/v10102-012-0006-5.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* (2000) «The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection». *Veterinary Parasitology*, 90(1-2), pp. 37-45. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00223-5.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* (2011) «LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis». *Parasites and Vectors* (BioMed Central Ltd.), 4(1), p. 86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86.
- TABARI, M.A., YOUSSEFI, M.R. (2016) «Antileishmanial activity of *Artemisia sieberi* essential oil against *Leishmania infantum* in vitro». *Advanced Herbal Medicine*, 2(2), pp. 40-46.

- TEJADA, R. (2016) «Artemisia annua contra la leishmaniosis canina: cuatro casos clínicos». *Revista de Fitoterapia*, 16(2), pp. 123-129.
- ULLAH, N. *et al.* (2016) «Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario». *Phytotherapy Research*, 30(12), pp. 1905-1925. doi: 10.1002/ptr.5710.
- VANACLOCHA, B., Cañigüeral, S. (ed) *Fitoterapia, Vademécum de Prescripción*. 5ª ed. Barcelona: Elsevier, 2019. 830 páginas. ISBN: 978-84-9113-299-8.
- VENNERSTROM, J.L. *et al.* (2012) «Berberine derivatives as antileishmanial drugs». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(5), pp. 918-921. doi: 10.1128/aac.34.5.918.
- WENIGER, B. *et al.* (2001) «Antiprotozoal activities of Colombian plants». *Journal of Ethnopharmacology*, 78(2-3), pp. 193-200. doi: 10.1016/S0378-8741(01)00346-4.