



# ESTRATEGIAS ÓMICAS EN EL DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por microorganismos unicelulares del género *Leishmania* que se transmiten a través de la picadura de pequeñas moscas denominadas flebótomos o moscas de la arena.



**JOSE CARLOS SOLANA,**  
Investigador postdoctoral. Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC).



**LORENA BERNARDO,**  
Investigador postdoctoral. Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC).



**ANA TORRES,**  
Investigador predoctoral. Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC).

## La leishmaniasis en España y en el mundo

Cuando pensamos en leishmaniasis, seguramente nos venga a la cabeza la idea de un perro afectado de una grave enfermedad que cursa con heridas en la piel, adelgazamiento, debilidad generalizada y que suele acabar con la vida del animal. Aunque *Leishmania infantum*, la especie endémica en España, afecta de forma especialmente grave a los perros (la incidencia es de hasta el 30%), la leishmaniasis es fundamentalmente una enfermedad humana conocida desde la Antigüedad. Se sitúa como la novena causa de enfermedad infecciosa más importante a nivel mundial, con más de 350 millones de personas en riesgo y alrededor de 1 millón de casos anuales en zonas tropicales y subtropicales. En Europa, la leishmaniasis es una enfermedad emergente que afecta de forma endémica a la Cuenca Mediterránea, siendo España el país que reporta el mayor número de casos (entre 300 y 400 por año). Y, además, desde el que se están exportando casos a países no endémicos del centro y norte de Europa por visitantes

que se infectan durante sus vacaciones y posteriormente desarrollan la enfermedad en su país de origen<sup>1</sup>.

El manejo de la leishmaniasis es complejo debido a que el progreso de la infección y tipo de manifestación clínica dependen de múltiples factores. A grandes rasgos, según la especie de *Leishmania* y la respuesta inmunitaria del hospedador ante la infección, estos parásitos pueden permanecer en la piel, donde aparecen lesiones y úlceras (leishmaniasis cutánea), invadir las mucosas de la nariz y la boca provocando la destrucción del tejido y graves desfiguraciones (leishmaniasis mucocutánea), e incluso alcanzar el bazo, el hígado o la médula ósea hasta terminar con la muerte del individuo si no se instaura un tratamiento (leishmaniasis visceral). A esta complejidad intrínseca de la leishmaniasis se suma que es una de las enfermedades desatendidas u olvidadas según la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo cual implica que aún hoy existan grandes retos en su diagnóstico, tratamiento y control.

El Laboratorio de Referencia en Leishmaniasis liderado por el Dr. Javier Moreno, localizado en el Centro Nacional

de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, es desde hace más de 25 años Centro Colaborador de la OMS. Entre sus funciones destacan el apoyo al Sistema Nacional de Salud y a la OMS, con técnicas de diagnóstico y estudios con los que abordar importantes huecos del conocimiento sobre la enfermedad y la biología de *Leishmania* que ayuden a la población afectada. En este sentido, y debido a que en los últimos años se están realizando grandes avances tecnológicos en el análisis de alto rendimiento del ADN o de las proteínas (las denominadas "ómicas"), se ha establecido un grupo de trabajo multidisciplinar enmarcado en el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC) que incluye a profesionales de distintos grupos de investigación en leishmaniasis, así como clínicos, para desarrollar nuevos estudios y análisis basados en estrategias ómicas.

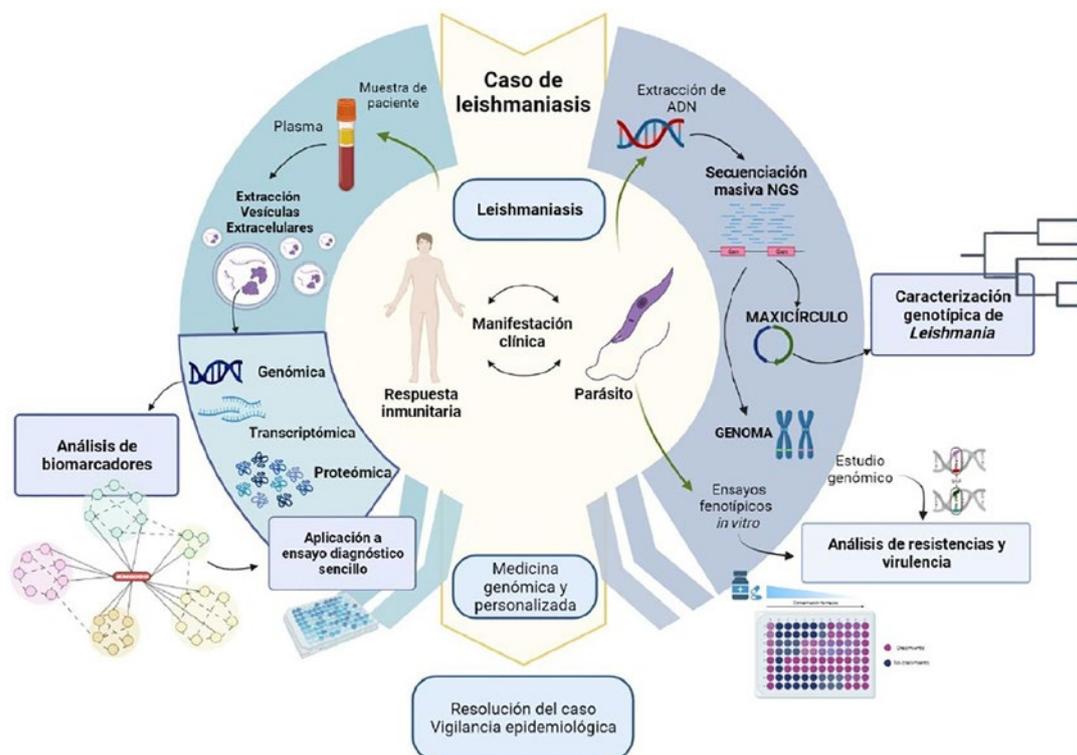
### Caracterización molecular de *Leishmania*

Estudios recientes basados en **técnicas de secuenciación masiva (NGS)** del ADN de *Leishmania* están evidenciando la necesidad de realizar una caracterización molecular completa del parásito responsable de los casos de leishmaniasis en España. Gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Dr. Jose María Requena en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Universidad Autónoma de Madrid), se han conseguido identificar en España dos grandes poblaciones de cepas genéticamente distintas de *Leishmania* mediante un nuevo tipo de **análisis filogenético** basado en la secuencia completa del **maxicículo** del parásito, una estructura característica de este grupo de microorganismos equivalente al ADN mitocondrial<sup>2</sup>. Además, gracias al trabajo previo de este grupo para ensamblar y caracterizar el **genoma de referencia** de la especie *L. infantum*, ha sido posible realizar un **estudio genómico** completo de estas dos poblaciones<sup>3</sup>. Una de ellas muestra un perfil genético estable que podría asociarse con las cepas de *L. infantum* responsables de los casos que han venido produciéndose habitualmente en nuestro país. La otra población coexiste con la anterior en la misma área geográfica, pero parece encontrarse en mitad de un proceso evolutivo muy activo, evidenciado por una gran variabilidad en la secuencia de su genoma, posiblemente debido a fenómenos de hibridación con otras cepas y especies de *Leishmania* y/o a la adaptación a nuevos hospedadores<sup>2</sup>. Algunos indicios apuntan a que esta población puede estar relacionada con el gran aumento de casos de leishmaniasis humana registrado hace 10 años en el área metropolitana del suroeste de Madrid, que terminó por convertirse en el mayor brote de leishmaniasis en Europa. Precisamente en este brote se han identificado a liebres y conejos como nuevos hospedadores reservorios de la enfermedad (además del perro), con un papel clave en su desarrollo<sup>4</sup>.

Esta variabilidad genética confiere a *Leishmania* una gran plasticidad con la que es capaz de adaptarse fácilmente a cambios en el entorno, y es la herramienta fundamental para evadir la respuesta inmunitaria e incrementar su virulencia y/o la probabilidad de adquirir **resistencia al tratamiento antiparasitario**. De manera complementaria a un estudio *in vitro* para determinar la resistencia de cada cepa a los fármacos, el **análisis genómico** está permitiendo identificar que esta adaptación se asocia no solo con mutaciones en el genoma sino también con un aumento o disminución del número de copias de estos genes o incluso de las regiones cromosómicas en las que se encuentran. Esto puede conllevar cambios en la expresión de otros muchos genes cercanos que pueden estar implicados en la resistencia o susceptibilidad hacia otros fármacos, o en la virulencia del parásito. De este modo, pueden estar seleccionándose resistencias de forma inadvertida incluso sin una exposición previa al fármaco. Dado que el tratamiento se basa en un número muy limitado de fármacos, estos análisis son fundamentales para elegir el mejor tratamiento y evitar un importante riesgo epidemiológico de salud pública.

### Búsqueda de nuevos biomarcadores en leishmaniasis

Gracias a la buena salud general de la población en España la mayoría de infecciones son asintomáticas. Sin embargo, esto no es así en parte de la población que se encuentra en un estado de inmunosupresión, cuya probabilidad de desarrollar leishmaniasis tras una primera infección puede aumentar hasta 418 veces con respecto a la población general. Por ejemplo, es bien conocida la asociación entre leishmaniasis y la inmunosupresión debida a la coinfección con VIH<sup>5</sup>. En estos pacientes existe un elevado riesgo de fracaso terapéutico y recaída por la reactivación de la multiplicación de los parásitos tras el tratamiento antiparasitario, muchas veces mantenido de forma profiláctica. Por otro lado, existe un uso cada vez mayor de fármacos inmunosupresores para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y el manejo de individuos trasplantados. Este tipo de inmunosupresión farmacológica tiene complicaciones adicionales cuando se asocia a una infección con *Leishmania* porque no siempre es posible retirar el tratamiento inmunosupresor cuando se detecta el caso de leishmaniasis sin poner en riesgo al paciente, ni tampoco está claro cuándo se puede volver a introducir sin riesgo de recaída. El tratamiento para la leishmaniasis tiene importantes efectos secundarios, por lo que su administración continuada produce problemas de salud y, además, si debido a las recaídas es necesario repetir pautas de tratamiento con eficacia incompleta se favorece la aparición y selección de cepas de *Leishmania*



resistentes al mismo. Aunque desde el Laboratorio de Referencia Nacional se han establecido técnicas para evaluar la respuesta inmunitaria para determinar el momento de cura y retirada del tratamiento antiparasitario y/o reintroducción del fármaco inmunosupresor<sup>6</sup>, aún no somos capaces de predecir con suficiente antelación el progreso de la infección para evitar estas recaídas. Para ello, se está llevando a cabo una búsqueda de **nuevos biomarcadores inmunológicos, parasitológicos y bioquímicos** en **vesículas extracelulares** presentes en la sangre de los pacientes mediante una aproximación **proteómica, transcriptómica y genómica**. Estas vesículas son unas estructuras biológicas que contienen diferentes moléculas informativas sobre el estado fisiológico y patológico de los pacientes. Su análisis se complementará con el estudio genético del parásito descrito arriba para caracterizar el caso clínico.

## La medicina personalizada ha llegado a las enfermedades olvidadas

Como ya ocurre con otras patologías a las que por su importancia en nuestra sociedad se destinan gran cantidad de recursos, la implementación cada vez mayor de las nuevas técnicas biotecnológicas está permitiendo que la lucha contra las enfermedades olvidadas y de la pobreza pueda beneficiarse de ellas. España lidera la investigación biomédica en este campo con la creación de un grupo de trabajo multidisciplinar, enmarcado en CIBERINFEC y, liderado por el Instituto

de Salud Carlos III. Este grupo es pionero en el desarrollo de aproximaciones ómicas para leishmaniasis en las que el diagnóstico y el tratamiento se ajustan a las circunstancias individuales de cada paciente, lo que se conoce como **medicina genómica y personalizada**. Asimismo, el establecimiento de esta red tiene la función de realizar una vigilancia y análisis de los casos de leishmaniasis con la que evitar brotes epidémicos y controlar este tipo de alertas sanitarias.

## Referencias:

1. Ready, P.D., *Leishmaniasis emergence in Europe*. Euro Surveill, 2010. 15(10): p. 19505.
2. Solana, J.C., et al., *Assembly of a Large Collection of Maxicircle Sequences and Their Usefulness for Leishmania Taxonomy and Strain Typing*. Genes (Basel), 2022. 13(6).
3. Gonzalez-de la Fuente, S., et al., *Resequencing of the Leishmania infantum (strain JPCM5) genome and de novo assembly into 36 contigs*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 18050.
4. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid., *Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios*. 2017.
5. Alvar, J., et al., *The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years*. Clin Microbiol Rev, 2008. 21(2): p. 334-59, table of contents.
6. Botana, L., et al., *Leishmaniasis: A new method for confirming cure and detecting asymptomatic infection in patients receiving immunosuppressive treatment for autoimmune disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2018 15(8): e0009662.

# It's Easy To See



# BET Sustainability

LAL Reagent Comparison Table	Conventional LAL Reagent	ACC's PyroSmart NextGen® (rCR) Reagent	First Generation Competitor (rFC) Reagent
<b>Sustainable Reagent</b> (animal free)	<b>No</b>	✓ <b>Horseshoe Crab Blood Free</b>	✓ <b>Horseshoe Crab Blood Free</b>
Kinetic Assay	Kinetic	✓ Kinetic	✗ No. Endpoint only
Assay Setup	Single step reconstitution	✓ Single step reconstitution	✗ No. rFC requires three reagents in a 1:4:5 ratio and a 10 min. pre-incubation step
Same Standard Plate Reader	Incubating plate or tube reader at 405 nm	✓ Yes. Incubating plate or tube reader at 405 nm	✗ No. Fluorescent reader required
Derived From <i>Limulus</i> Amebocyte Lysate (LAL)	LAL	✓ Yes. rCR is recombinant LAL	✗ No. Based on <i>Carcinoscorpius</i> or <i>Tachyplesus</i> Amebocyte Lysate (CAL/TAL)
Multi-step Cascade Pathway	Yes	✓ Yes	✗ No
Endotoxin Specific	No	✓ Endotoxin Specific	✓ Endotoxin Specific

