



# BIOMARCADORES EN LA LUCHA CONTRA LA LEISHMANIASIS

En España la leishmaniasis es una enfermedad endémica producida por parásitos de la especie *Leishmania infantum* que infectan células fagocíticas del sistema inmunitario (fundamentalmente macrófagos). De forma general, esta enfermedad es más conocida en la clínica veterinaria por afectar a los perros (su principal reservorio), causándoles heridas en la piel y debilitándoles progresivamente hasta acabar con la vida del animal.



LORENA BERNARDO, ANA TORRES Y JOSE CARLOS SOLANA, Investigadores postdoctorales. Centro Nacional de Microbiología, CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III.

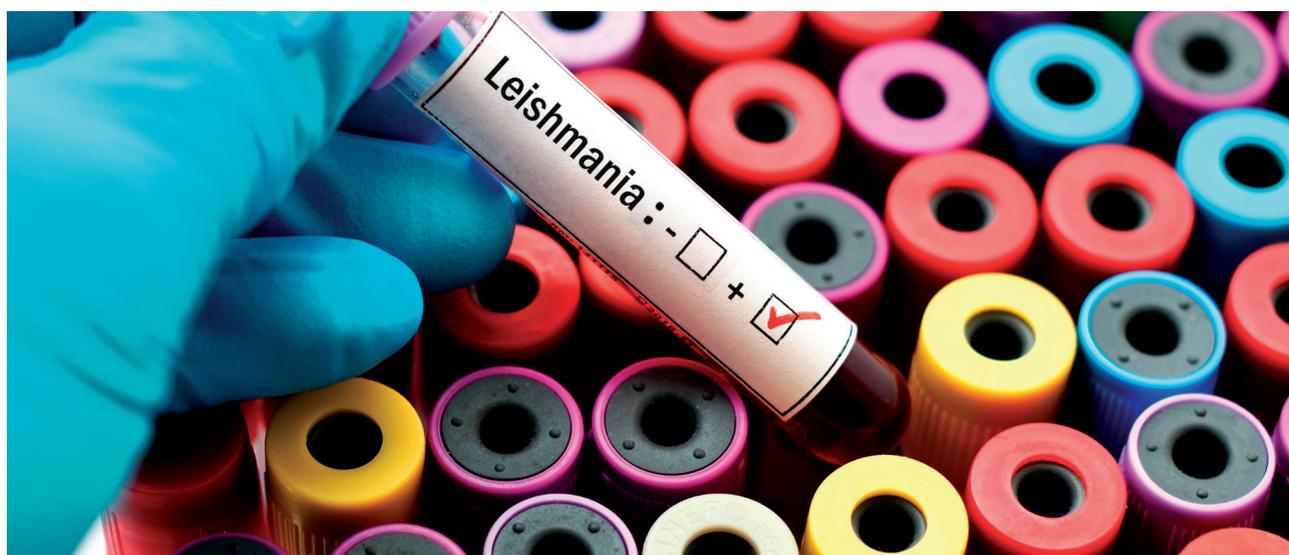
Pero, además, la leishmaniasis se sitúa en la novena posición dentro de la lista de enfermedades infecciosas humanas más importantes publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), causando más de 1 millón de casos cada año en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. En la Cuenca Mediterránea, la leishmaniasis es una enfermedad endémica y emergente, y **España es el país con más casos humanos reportados**, entre 300 y 400 cada año. Destaca la aparición en 2009 de un brote de leishmaniasis humana en el suroeste de la Comunidad de Madrid, el más grande de toda Europa. Además, desde nuestro país se están exportando casos de leishmaniasis hacia países no endémicos a través de turistas que se infectan durante sus vacaciones y desarrollan la enfermedad en su país de origen <sup>(1)</sup>.

El manejo clínico de la enfermedad es complejo ya que depende de una gran variedad de factores entre los que se encuentran la especie de *Leishmania* infectante y el sistema inmunitario del hospedador, que van a determinar el tipo de manifestación clínica que se produzca. Además, la leishmaniasis es **una de las enfermedades más desatendidas y olvidadas** según la OMS. Todo ello hace que sea difícil establecer las medidas de control oportunas y disponer de herramientas para el diagnóstico y el tratamiento que ayuden a los pacientes que sufren esta enfermedad. Es en este contexto donde la búsqueda de

biomarcadores juega un papel esencial. Estos biomarcadores son moléculas presentes en el paciente que proporcionan información de gran utilidad sobre su estado. Existe una gran necesidad de identificar biomarcadores que permitan realizar un buen diagnóstico, además de ajustes precisos en el tratamiento para evitar recaídas, y que también sirvan como herramienta para respaldar la investigación de nuevos enfoques terapéuticos <sup>(2)</sup>.

## Biomarcadores empleados actualmente en la leishmaniasis

El Laboratorio Nacional de Referencia e Investigación en Leishmaniasis, localizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, lleva desarrollando desde hace años una línea de investigación centrada en la búsqueda de biomarcadores con los que apoyar al Sistema Nacional de Salud y a la OMS en el manejo clínico de los pacientes con leishmaniasis. Fruto de este trabajo, actualmente disponemos de técnicas acreditadas con las que se realiza un diagnóstico basado en distintos biomarcadores: la presencia de **ADN del parásito**, la producción de **anticuerpos anti-Leishmania** y la activación de la **respuesta inmunitaria celular**. Está documentado que los individuos enfermos tienen en su sangre una gran cantidad de anticuerpos contra el parásito, mientras que



aquellos resistentes o que se han curado han sido capaces de desarrollar una respuesta celular mediada por un subtipo de linfocitos encargados de potenciar la eliminación de patógenos intracelulares.

Entre las técnicas desarrolladas destinadas a evaluar la respuesta celular destaca en primer lugar, la **linfoproliferación celular o CPA** (por sus siglas en inglés cell proliferation assay). Esta herramienta se basa en el aislamiento y posterior estimulación de las células mononucleares de sangre periférica con proteínas de *Leishmania* <sup>(3)</sup>. Mientras que las células de pacientes con una enfermedad activa no van a ser capaces de proliferar frente al estímulo (valor de CPA negativo), los individuos curados y resistentes van a presentar una respuesta de memoria capaz de multiplicar el número de linfocitos que responden frente al mismo (CPA positiva).

Otro tipo de técnicas aprovechan la liberación de biomarcadores solubles en la sangre (citoquinas) que pueden producirse tras la **estimulación de sangre completa** (WBA, del inglés whole blood assay) con proteínas de *Leishmania*. Algunos de estos biomarcadores son interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleuquina-2 (IL-2) y la proteína 10 inducida por interferón (IP-10), los cuales son producidos de forma específica en individuos curados. Aunque la base científica es similar a la anterior, esta herramienta ofrece ventajas en la instauración de un diagnóstico en los puntos de atención en el terreno, pues no requiere del aislamiento de las células de la sangre y la estimulación de la misma no supera las 24 h.

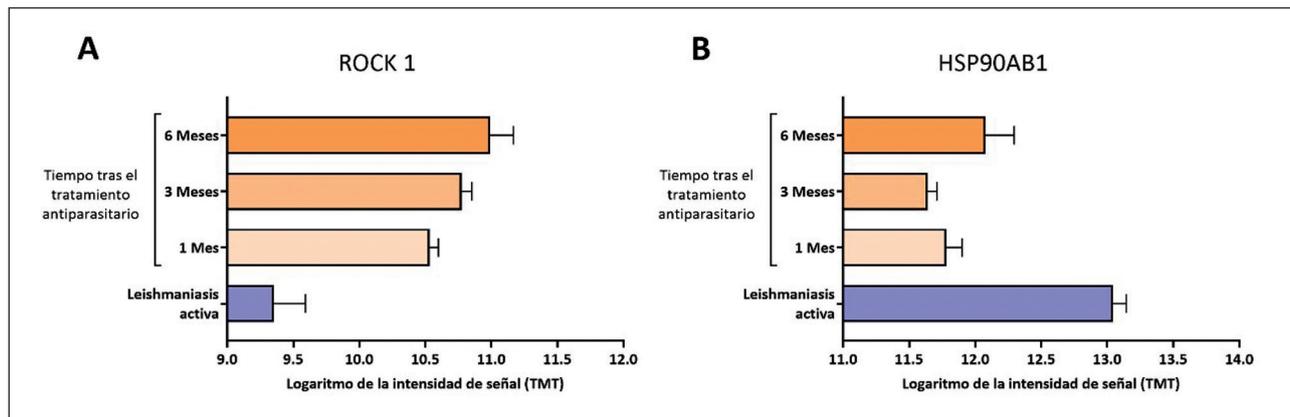
No obstante, aún son necesarios biomarcadores que nos permitan determinar la enfermedad y la cura con mayor exactitud, así como evaluar el riesgo de recaída, especialmente frecuentes en aquellos pacientes que presentan un sistema inmunitario debilitado <sup>(4,5)</sup>. Estos son, por ejemplo,

pacientes coinfectados con VIH, individuos que sufren malnutrición, o aquellos que reciben un tratamiento inmunosupresor debido a un trasplante u otra patología. El manejo de estos pacientes es un reto para el que es necesario realizar una nueva búsqueda de biomarcadores.

### Nuevas aproximaciones en la búsqueda de biomarcadores

En la última década, el interés por la investigación en **Vesículas Extracelulares** (VE) ha experimentado un notable aumento entre las distintas aproximaciones para el estudio de biomarcadores. Estas partículas, presentes en diversos fluidos corporales como plasma, suero y orina, albergan un patrón distintivo de moléculas determinado por su célula de origen <sup>(6,7)</sup>. Además, desempeñan un papel crucial en la comunicación celular, influyendo en procesos biológicos fundamentales como la proliferación celular, el metabolismo y la respuesta inmunológica <sup>(8)</sup>. Por lo tanto, estas vesículas proporcionan información relevante sobre el estado inmunológico y patológico de los pacientes. Una fuente clave de VEs en estudios de biomarcadores es el plasma, que se caracteriza por su accesibilidad y almacenamiento rutinario en biobancos.

Es por ello que desde Laboratorio de Leishmaniasis hemos planteado una nueva línea de investigación basada en la búsqueda de **biomarcadores de cura en VEs aisladas del plasma** de pacientes del pasado brote de leishmaniasis de la Comunidad de Madrid. Mediante una combinación de técnicas basadas en la exclusión molecular por tamaño y la ultracentrifugación a gran velocidad <sup>(9)</sup>, se aislaron las VEs del plasma de pacientes que acudieron al hospital con leishmaniasis activa y de pacientes que habían recibido tratamiento antiparasitario 1, 3 o 6 meses antes.



Representación gráfica de los niveles de expresión de las proteínas ROCK1 y HSP90AB1 en los distintos grupos de pacientes. Los niveles de expresión se determinan mediante el marcaje de las proteínas con una señal medible (TMT). En el eje Y se indica la intensidad de este marcaje, que es directamente proporcional con la cantidad de proteína presente en la muestra.

Posteriormente, en el Instituto de Salud Carlos III, se realizó un análisis del contenido de estas vesículas, específicamente de las proteínas (**estudio proteómico**).

Los resultados han revelado importantes **diferencias en la abundancia de más de 150 proteínas** entre los pacientes con una enfermedad activa y aquellos que han recibido tratamiento, indicando la existencia de un perfil proteico característico y distinguible para cada grupo de individuos. Muchas de estas proteínas participan en procesos biológicos relacionados con la transducción de señales y están implicadas en el desarrollo de la leishmaniasis y la respuesta inmunológica a la infección. Algunas de ellas tienen un potencial como biomarcadores capaces de **discriminar entre individuos enfermos y curados**. Por ejemplo, la proteína ROCK1 (Figura 1A) es más abundante en las VEs de los pacientes curados, mientras que HSP90AB1 es más abundante en los enfermos (Figura 1B). Además, las diferencias en la abundancia de ambas proteínas durante el seguimiento a 1, 3 y 6 meses post-tratamiento abre la posibilidad de que también puedan ser **biomarcadores tempranos de cura**. Esto sería de gran interés, dado que actualmente las guías de manejo clínico de la OMS indican que deben transcurrir 6 meses tras el tratamiento en ausencia de recaída para determinar que se ha alcanzado la cura. Poder certificar el éxito de un tratamiento (o alertar del riesgo de recaída) y establecer el estado de cura de forma más temprana ayudaría en gran medida al manejo de estos pacientes, especialmente en los lugares donde la hospitalización es poco accesible o muy costosa.

Estos resultados evidencian que la investigación de VEs aisladas de plasma es una vía muy prometedora para la

identificación de biomarcadores en enfermedades infecciosas. La validación de estos potenciales biomarcadores identificados se realiza mediante técnicas rutinarias del laboratorio para su detección en una muestra clínica, como la técnica ELISA. Esto garantizaría su utilidad y permitiría su aplicación directa en la mejora del diagnóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento de los casos de leishmaniasis.

## Bibliografía

1. Ready P. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*. 2010;15(10):19505.
2. Carrillo E, Moreno J. Editorial: Biomarkers in Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:388.
3. Botana L, Matia B, San Martin JV, Romero-Mate A, Castro A, Molina L, et al. Cellular Markers of Active Disease and Cure in Different Forms of Leishmania infantum-Induced Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:381.
4. Ibarra-Meneses AV, Moreno J, Carrillo E. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2020;36(1):29-38.
5. Botana L, Ibarra-Meneses AV, Sanchez C, Matia B, San Martin JV, Moreno J, 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*. 2021;15(8):e0009662.
6. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
7. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019;8(7).
8. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-93.
9. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med*. 2015;36(1):11-7.