

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de la respuesta inmune frente a *Leishmania*  
en individuos inmunodepresivos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Laura Botana Veguillas**

Directores

**Eugenia Carrillo Gallego**  
**Francisco Javier Moreno Nuncio**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de la respuesta inmune frente a *Leishmania* en  
individuos inmunodeprimidos**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**Laura Botana Veguillas**

Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología.  
Centro Nacional de Microbiología.

Instituto de Salud Carlos III

**Abril, 2019**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de la respuesta inmune frente a *Leishmania* en  
individuos inmunodeprimidos**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**Laura Botana Veguillas**



**Directores:**

**Dra. Eugenia Carrillo Gallego**

**Dr. Francisco Javier Moreno Nuncio**

**Tutor académico:**

**Dr. Francisco Bolás**





U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Laura Botana Veguillas,  
estudiante en el Programa de Doctorado de Microbiología y Parasitología,  
de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,  
como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Caracterización de la respuesta inmune frente a *Leishmania* en individuos inmunodeprimidos

y dirigida por: Dr. Francisco Javier Moreno Nuncio y la Dra. Eugenia Carrillo Gallego

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 23 de abril de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.





**Dña. Eugenia Carrillo Gallego**, investigadora postdoctoral de la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda,

**D. Francisco Javier Moreno Nuncio**, responsable del Servicio de Parasitología y Jefe de la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “**Caracterización de la respuesta inmune frente a *Leishmania* en individuos inmunodeprimidos**” que presenta la Graduada en Biología y Máster en Microbiología aplicada a la Salud Pública e investigación en enfermedades infecciosas, **Dña. Laura Botana Veguillas** para obtener el grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, 23 de abril de 2019.

Fdo. Eugenia Carrillo Gallego

Directora de la tesis doctoral

Fdo. Francisco Javier Moreno Nuncio

Director de la tesis doctoral



A mi familia

“La imaginación es la facultad del descubrimiento”

Ada Byron



## **Agradecimientos**

A lo largo de estos años han sido numerosas las personas que de manera más directa o indirecta han ayudado a que esta tesis fuese posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores el doctor Javier Moreno y la doctora Eugenia Carrillo. Gracias por brindarme la oportunidad desde el momento que puse un pie en el laboratorio pidiendo hacer las prácticas extracurriculares. Eugenia, gracias por confiar en mí, por cada una de las correcciones, por toda la ayuda y por todo el tiempo que has invertido para que todo salga bien. Javier gracias por darme la oportunidad de que todo esto sea posible, por el apoyo y por dirigirme en la dirección correcta. Gracias a ambos por dejarme formar parte de este grupo, por todo lo que me habéis enseñado y por ayudarme a llegar hasta aquí.

A Carmen, solo puedo tener palabras sinceras de agradecimiento hacia ti. Gracias por acogerme desde el minuto uno. Gracias por enseñarme todo lo que ahora sé. Gracias por cada palabra de ánimo y por cada abrazo. Gracias, de corazón porque sabes que sin tu trabajo el mío no existiría siempre lo dire. Gracias por todo lo que hemos compartido durante todos estos años y lo que queda por venir.

A Laura y Ana, el laboratorio nos hizo compañeras pero el tiempo nos transformó en amigas. Gracias por estar siempre que os he necesitado. Gracias por esas charlas, las científicas y las que no lo eran (no vamos a mentir). Gracias por ser capaces de hacerme llorar de la risa y reír a pesar de las lágrimas. Lauri, muchas gracias porque aunque nos vemos menos de lo que nos gustaría, continuas estando cada vez que lo necesito. Ana gracias por todos los congresos, los cursos, los aviones, los nervios y todo lo que hemos pasado juntas. Nos queda mucho por delante solo tenemos que disfrutarlo.

A Lorena y a José Carlos, los más recientes en este equipo gracias por las conversaciones, el apoyo y la ayuda que me habéis dado.

A toda la gente del laboratorio de Leishmaniasis y enfermedad de Chagas Javier, Carmen, María, Emi, Silva y Sheila gracias por dejarme formar parte del grupo. En especial gracias al doctor Javier Nieto por su ánimo constante y sus palabras.

A Valter, Giorgi, Alba, Inés, Isma, Selene vuestro paso por el laboratorio me hizo aprender y me brindaron una oportunidad única.

A toda la gente del servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III, gracias por acogerme en el grupo y hacerme sentir como en casa.

A Elena comenzamos esta andadura en el campo de la Parasitología juntas en los laboratorios de la universidad y ahora hemos terminado también juntas este ciclo, solo puedo darte las gracias por todo.

A Ana, mi compañera matutina de cafés, gracias por aguantarme y hacerme las mañanas más animadas.

A la doctora Anabela Cordeiro por permitirme realizar allí mi estancia y a todo su equipo por hacerme un hueco temporal en su laboratorio. En especial a Begoña, por todo lo que me enseñó y por todo lo que pude aprender de ella durante esos meses.

Al doctor Benito Muñoz, gracias por hacer que algo tan simple como pueden parecer unas prácticas de la carrera se convirtiesen en el descubrimiento del mundo de la Parasitología.

Al doctor Francisco Bolás, gracias por su inestimable ayuda como tutor. Gracias por las conversaciones compartidas y las palabras.

Al doctor Juan Victor San Martín, gracias por ayudarme a entender toda la parte clínica que hay detrás de este trabajo y por estar siempre atento a todas las dudas que pudiesen surgirme.

A mis padres y a mis abuelos. Gracias porque desde pequeña despertasteis en mí el gusanillo de la curiosidad y el gusto por la lectura. Gracias por ser el espejo en el que mirarme y las huellas que seguir. Gracias por hacer siempre lo que haya estado en vuestra mano para ayudarme a lograr todo lo que me he ido planteando. A mi hermana, porque realmente nada habría sido lo mismo sin ti. Gracias, porque vuestro esfuerzo también forma parte de esta tesis.

A Mingo. Dicen que los amigos son la familia que se elige y en nuestro caso no encuentro mejor forma de definirlo. Porque no importa el tiempo ni la distancia, sé que solo necesito una llamada para sentirme en casa.

A Cris, porque a pesar de la distancia siempre has estado ahí. Por tener un ratito para mí cada vez que vienes de visita por muy fugaz que sea.

A Amaya, porque aunque nos separen miles de kilómetros y los horarios no siempre acompañen para mantener una conversación fluida, gracias por estar siempre al otro lado de la pantalla preguntando cómo va todo, interesándote y ofreciéndote para ayudar en todo lo que este en tu mano.

A Carlos gracias por entender a tu amiga, por tener siempre preparado un chiste para sacarme una sonrisa y por todo lo que has hecho por mi durante este tiempo.

A Ainhoa, porque aunque apenas nos veamos, sé que te tengo siempre, me lo has demostrado y eso no tiene precio.

Por último, pero no por ello menos importante ya que ni mucho menos es así, a Jose Luis. Gracias por acompañarme en esta aventura en la que decidí embarcarme aun cuando no sabías todo lo que significaba ni lo que implicaba. Gracias por intentar entender todo lo que aquí está escrito aunque ni de lejos sea tu campo. Gracias por tu infinita paciencia cada vez que te contaba algo, mientras intentabas descifrar parte de mis palabras. Gracias por aguantar tanto los días buenos como los regulares. Gracias por tener siempre preparada la palabra de ánimo adecuada y un abrazo de los que salva. Gracias por ser siempre tú conmigo, por sumar cuando todo lo demás divide.



# Indice

Indice.....	i
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	iii
Summary.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Leishmaniasis.....	3
1.2 Formas clínicas de la enfermedad.....	4
1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC).....	4
1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LM).....	4
1.2.3 Leishmaniasis visceral (LV).....	4
1.2.4 Leishmaniasis dérmica post Kala-azar (PKDL).....	5
1.3 Infección asintomática por <i>Leishmania</i> .....	5
1.4 Epidemiología de la leishmaniasis.....	7
1.4.1 La leishmaniasis en Europa.....	8
1.4.2 La leishmaniasis en España.....	8
1.5 Respuesta inmune frente a la leishmaniasis.....	10
1.5.1 Respuesta inmune innata.....	10
1.5.2 Respuesta inmune celular adaptativa.....	13
1.5.3 Respuesta inmune humoral.....	16
1.5.4 Respuesta inmune en la coinfección VIH- <i>Leishmania</i> .....	17
1.5.5 Agotamiento celular.....	18
1.6 Diagnóstico de la leishmaniasis.....	19
1.6.1 Detección directa del parásito.....	19
1.6.2 Inmunodiagnóstico / diagnóstico serológico.....	20
1.6.3 Diagnóstico molecular.....	21
1.6.4 Detección de antígeno.....	22
1.6.5 Diagnóstico celular.....	23

1.7 Tratamiento .....	24
1.8 Leishmaniasis e inmunosupresión .....	26
1.8.1 Coinfección VIH- <i>Leishmania</i> .....	26
1.8.2 Enfermedades autoinmunes y leishmaniasis .....	30
1.8.3 Trasplante de órganos y leishmaniasis .....	32
1.8.4 Malnutrición y leishmaniasis .....	33
1.9 Principales retos en el control de la leishmaniasis visceral .....	34
OBJETIVOS.....	2
2.    Objetivos.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
3.    Materiales y métodos.....	43
3.1 Población de estudio .....	43
3.1.1 Características de los sujetos controles .....	44
3.1.2 Características de los pacientes que desarrollaron leishmaniasis visceral .....	45
3.1.3 Consideraciones éticas y financiación .....	46
3.2 Métodos de laboratorio.....	46
3.2.1 Obtención de muestras.....	46
3.2.2 Preparación del antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (SLA).....	47
3.2.3 Ensayo de proliferación celular .....	47
3.2.4 Tinción de subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica.....	52
3.2.5 Pruebas serológicas.....	55
3.2.6 Pruebas parasitológicas.....	58
3.2.7 Determinación de la carga viral en los pacientes con VIH .....	61
3.2.8 Análisis estadístico .....	61
RESULTADOS .....	63
4.    Resultados .....	65
4.1 Estudio y caracterización de individuos con infección asintomática por <i>Leishmania</i> que no han sufrido un episodio previo de la enfermedad.....	65
4.1.1 Caracterización molecular, serológica y celular de individuos inmunocompetentes sin leishmaniasis clínica .....	65
4.1.1.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los sujetos controles negativos y asintomáticos inmunocompetentes .....	67

4.1.2 Caracterización molecular, serológica y celular de individuos inmunosuprimidos farmacológicamente sin leishmaniasis clínica .....	69
4.1.2.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los sujetos controles y asintomáticos inmunosuprimidos farmacológicamente.....	71
4.1.3 Caracterización molecular, serológica y celular de sujetos infectados por el VIH sin leishmaniasis clínica .....	73
4.1.3.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los sujetos controles negativos y asintomáticos infectados por el VIH.....	74
4.1.4 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias circulantes de los sujetos controles negativos y asintomáticos inmunocompetentes, inmunosuprimidos farmacológicamente e infectados por el VIH.....	77
4.1.5 Resumen de las características generales de los sujetos con infección asintomática por <i>Leishmania</i> .....	78
4.2 Estudio, caracterización y monitorización de la cura de los pacientes con leishmaniasis clínica.....	80
4.2.1 Caracterización molecular, serológica y celular de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa y curada.....	80
4.2.1.1 Estudio de la producción de citoquinas y granzima B en pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa y curada.....	82
4.2.2 Caracterización molecular, serológica y celular de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa y curada.....	84
4.2.2.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa y curada.....	86
4.2.2.2 Seguimiento de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral .....	88
4.2.3 Caracterización molecular, serológica y celular de los pacientes infectados por el VIH con leishmaniasis visceral activa y curada.....	89
4.2.3.1 Estudio de la secreción específica de citoquinas en los pacientes infectados por el VIH con leishmaniasis visceral activa y curada.....	91
4.2.3.2 Seguimiento de los pacientes coinfectados VIH- <i>Leishmania</i> .....	94
4.2.4 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias circulantes de los pacientes con leishmaniasis visceral activa y curada inmunocompetentes, inmunosuprimidos farmacológicamente e infectados por el VIH .....	96
4.2.5 Resumen de las características generales de los pacientes con leishmaniasis visceral activa y curada .....	98
DISCUSIÓN.....	99
5. Discusión.....	101
5.1 Medida de la respuesta inmune celular para la identificación de sujetos asintomáticos...	101

5.1.1 Individuos inmunocompetentes .....	103
5.1.2 Individuos inmunosuprimidos farmacológicamente.....	104
5.1.3 Individuos infectados por VIH .....	105
5.2 Medida de la respuesta inmune celular para el seguimiento de pacientes con leishmaniasis visceral .....	107
5.2.1 Pacientes inmunocompetentes .....	108
5.2.2 Pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral .....	110
5.2.3. Pacientes coinfectados VIH- <i>Leishmania</i> .....	113
5.3 Aportaciones dentro los retos actuales para el control de la leishmaniasis .....	116
CONCLUSIONES.....	119
6. Conclusiones.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	123
Bibliografía .....	125
ANEXOS .....	147
Anexos.....	149

## **Abreviaturas**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**AUC:** área bajo la curva.

**BrdU:** 5-bromo-2´desoxiuridina.

**BSA:** albumina de suero bovino.

**DAT:** test de aglutinación directa.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína.

**GB:** Granzima B.

**GMP:** buenas prácticas de fabricación.

**HCl<sub>2</sub>:** ácido hipocloroso.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** ácido sulfúrico

**IC:** sujeto inmunocompetente

**IFI:** inmunofluorescencia indirecta.

**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma.

**IgG:** inmunoglobulina G.

**IL-:** interleuquina

**iNOS:** óxido nítrico sintetasa

**IS:** índice de estimulación.

**ISF:** paciente inmunosuprimido mediante la administración de fármacos.

**KAtex:** test de aglutinación para la detección de antígeno en orina.

**L-AmB:** anfotericina B liposomal.

**LC:** leishmaniasis cutánea.

**LCD:** leishmaniasis cutánea difusa.

**LM:** leishmaniasis mucocutánea.

**LST:** test en piel de leishmanina.

**LV:** leishmaniasis visceral.

**LVA:** leishmaniasis visceral activa.

**LVAC:** leishmaniasis visceral activa crónica.

**LVC:** leishmaniasis visceral curada.

**MA:** Glucantime®

**MFI:** intensidad de fluorescencia media.

**NaCl:** cloruro de sodio

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** carbonato sódico.

**NaHCO<sub>3</sub>:** bicarbonato sódico.

**NE:** neutrófilo elastasa.

**NNN:** medio Novy-MacNeal-Nicolle.

**NK:** células natural killer.

**NTD:** enfermedades tropicales desatendidas.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**ON:** óxido nítrico.

**OPD:** o-fenilendiamina.

**PBS:** tampón fosfato salino

**PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PD-1:** proteína de muerte programada

**PE:** ficoeritrina.

**PHA:** fitohemaglutinina tipo M

**PKDL:** leishmaniasis dérmica post Kala-azar

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**ROC:** Característica de funcionamiento del receptor (Receiver operating characteristic)

**RPMI:** medio Roswell Park Memorial Institute.

**SDS:** dodecilsulfato sódico.

**SIDA:** síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

**SLA:** antígeno soluble de *Leishmania*.

**SSG:** Pentosam®

**TAR:** tratamiento antirretroviral.

**TARGA:** terapia antirretroviral de gran afinidad.

**Tfh:** células T colaboradoras foliculares

**TLR:** receptor tipo toll.

**Tm:** temperatura de fusión (temperatura de melting)

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa.

**TOS:** trasplantado de órgano sólido.

**UDI:** usuario de drogas intravenosas.

**VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana.

**VIH-LV:** confección virus de la inmunodeficiencia humana-leishmaniasis visceral.



## Resumen

La leishmaniasis comprende un conjunto de enfermedades infecciosas causadas por protozoos parásitos, intracelulares obligados, del género *Leishmania*. La enfermedad tiene cuatro manifestaciones clínicas principales: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis visceral y leishmaniasis dérmica post-Kala-azar. La leishmaniasis es endémica en más de 98 países, incluidos España donde está causada por *Leishmania infantum*. Desde el año 2009, en el que se declaró un brote en la zona sudoeste de la Comunidad de Madrid, se han reportado más de 700 casos en esa área, principalmente en el municipio de Fuenlabrada. En la actualidad, existe la necesidad de un test de referencia que permita medir la respuesta inmune tras el tratamiento, monitorizar la cura y predecir las recaídas de los pacientes. Además, la mayoría de las infecciones permanecen asintomáticas, las cuales no son detectadas debido a que no existe un test de referencia, lo que dificulta conocer la extensión real de la infección por *Leishmania*. La inmunosupresión es el mayor factor de riesgo individual para el desarrollo de leishmaniasis visceral, existiendo en estos pacientes mayor riesgo de recaídas, peor respuesta al tratamiento y mayores tasas de mortalidad. Por todo lo anterior, el objetivo principal de esta tesis ha sido la evaluación de la técnica de linfoproliferación celular y la producción de citoquinas y granzima B frente al antígeno soluble de *Leishmania* (SLA) como ensayos de inmunidad celular para la identificación de marcadores relacionados con la infección asintomática y con la cura en la infección por *Leishmania infantum*. Los resultados mostraron que mientras que las técnicas moleculares y serológicas no permiten la detección de los sujetos asintomáticos, el empleo de la proliferación celular frente al antígeno SLA y la producción específica de IFN- $\gamma$  permitieron su identificación, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos. El estudio de las subpoblaciones linfocitarias puso de manifiesto que no existían diferencias en las mismas entre los sujetos control y los asintomáticos. Por otro lado, los pacientes con leishmaniasis visceral activa presentaron una inmunosupresión generalizada que no les permitió desarrollar una respuesta inmune frente al parásito. Sin embargo tras el tratamiento efectivo, estos pacientes desarrollaron una respuesta inmune frente a *Leishmania* de tipo Th1. Esta recuperación de la funcionalidad celular estuvo acompañada de la recuperación de los niveles de las subpoblaciones celulares. Esta técnica de inmunidad celular ha demostrado además ser un buen instrumento predictor de recaída, asociándose la falta de respuesta con el

desarrollo de la enfermedad clínica. Incluso, la producción específica de IFN- $\gamma$ , tras la estimulación con el antígeno SLA, ha hecho posible retirar la profilaxis secundaria en los pacientes VIH+ curados de leishmaniasis visceral, incluso con valores de T CD4+ por debajo de 200 células/mm<sup>3</sup>, sin recaídas hasta la fecha. También en los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, el desarrollo de una respuesta inmune celular frente al parásito, ha demostrado ser un buen marcador para la reintroducción del tratamiento inmunosupresor de manera segura. En conclusión, el ensayo de proliferación celular tras la estimulación con el antígeno SLA y la posterior determinación de IFN- $\gamma$ , han demostrado ser una técnica de utilidad para la detección de la infección asintomática. Además, ha servido para establecer la cura tras el tratamiento en pacientes con leishmaniasis visceral inmunocompetentes e inmunosuprimidos, tanto fármacológicamente como por infección por el VIH, así como ser de utilidad para los retos y necesidades que plantea el control de la leishmaniasis visceral humana en pacientes inmunodeprimidos.

## Summary

Leishmaniasis comprises a set of infectious diseases caused by parasitic, obligate intracellular protozoa of the genus *Leishmania*. The disease has four main clinical manifestations: cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, visceral leishmaniasis and post-Kala-azar dermal leishmaniasis. Leishmaniasis is endemic in more than 98 countries, including Spain where it is caused by *Leishmania infantum*. Since 2009, when an outbreak was declared in the southwestern area of the Community of Madrid, more than 700 cases have been reported in that area, mainly in the municipality of Fuenlabrada. Currently, there is a need for a reference test to measure the immune response after treatment, monitor the cure and predict relapse of patients. In addition, most infections remain asymptomatic, which are not detected because there is no reference test, which makes it difficult to know the true extent of *Leishmania* infection. Immunosuppression is the single greatest risk factor for the development of visceral leishmaniasis, with a higher risk of relapse, worse response to treatment and higher mortality rates in these patients. For all the above, the main objective of this thesis has been the evaluation of the technique of cellular lymphoproliferation and the production of cytokines and granzyme B against the soluble antigen of *Leishmania* (SLA) as cell immunity assays for the identification of markers related to asymptomatic infection and with cure in *Leishmania infantum* infection. The results showed that while molecular and serological techniques do not allow the detection of asymptomatic subjects, the use of cell proliferation against SLA antigen and the specific production of IFN- $\gamma$  allowed their identification, both in immunocompetent and immunosuppressed individuals. The study of the lymphocyte subpopulations showed that there were no differences in them between the control and asymptomatic subjects. On the other hand, patients with active visceral leishmaniasis presented a generalized immunosuppression that did not allow them to develop an immune response against the parasite. However, after effective treatment, these patients developed an immune response to Th1-type *Leishmania*. This recovery of cellular functionality was accompanied by the recovery of cellular subpopulation levels. This cellular immunity technique has also proved to be a good predictor of relapse, associating the lack of response with the development of clinical disease. Even the specific production of IFN- $\gamma$ , after stimulation with the SLA antigen, has made it possible to withdraw secondary prophylaxis in HIV + patients cured of visceral leishmaniasis, even with CD4 + T values below 200 cells / mm<sup>3</sup>,

without relapses till the date. Also in pharmacologically immunosuppressed patients, the development of a cellular immune response against the parasite has proven to be a good marker for the reintroduction of immunosuppressive treatment safely. In conclusion, the cell proliferation assay after stimulation with the SLA antigen and the subsequent determination of IFN- $\gamma$ , have proved to be a useful technique for the detection of asymptomatic infection. In addition, it has served to establish the cure after treatment in patients with immunocompetent and immunosuppressed visceral leishmaniasis, both drug-logically and by HIV infection, as well as being useful for the challenges and needs posed by the control of human visceral leishmaniasis in immunosuppressed patients.

---

# INTRODUCCIÓN

---



## 1. Introducción

### 1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis constituye un conjunto de enfermedades infecciosas causadas por protozoos parásitos de especies del género *Leishmania* que se transmiten por la picadura de hembras hematófagas de la familia *Psychodidae* (subfamilia *Phlebotominae*). Esta enfermedad es considerada una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas (NTD) por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre las enfermedades parasitarias, es la segunda en mortalidad tras la malaria, y la tercera en años de vida ajustados por discapacidad (DALYs) (Savoia 2015). En 2007, en la 60 Asamblea Mundial de la Salud se reconoció la leishmaniasis como una de las enfermedades tropicales más desatendidas y se aprobó la resolución 60.13 en la que se promueve el inicio, mantenimiento y expansión de los programas de control de la leishmaniasis en los países afectados (WHO 2017).

*Leishmania* es un protozoo parásito intracelular obligado, con un ciclo de vida digenético, que adquiere su forma amastigote dentro de las células fagocíticas (principalmente en los macrófagos) del hospedador vertebrado, mientras que en la probóscide de la hembra hematófaga, que actúa como vector, el parásito se encuentra en forma promastigote.

La leishmaniasis es, en la mayoría de los casos, una zoonosis en la que el reservorio de la enfermedad es muy variado, ya que diferentes especies de mamíferos salvajes o domésticos, incluidos roedores y perros pueden actuar como tal (Ashford 1996, Akhoundi, Kuhls et al. 2016, Travi, Cordeiro-da-Silva et al. 2018). Sin embargo, la infección por parásitos de las especies *Leishmania donovani* y *Leishmania tropica* es antroponótica (Pace 2014) siendo el reservorio principal los enfermos, los afectados por la forma dérmica post Kala-azar (PKDL) y los individuos asintomáticos (Bern, Maguire et al. 2008).

Además, en los años 90 se describió un ciclo artificial de transmisión antroponótica en sujetos coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el parásito, usuarios de drogas por vía intravenosa (UDI) que compartían jeringuillas, en los que estas actuaban como un vector artificial a la hora de transmitir la enfermedad (Alvar, Gutierrez-Solar et al. 1996).

### 1.2 Formas clínicas de la enfermedad

La leishmaniasis es una enfermedad compleja que depende de múltiples factores. Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad se clasifican en: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis visceral y leishmaniasis dérmica post Kala-azar. Distintos factores influyen en que un individuo infectado desarrolle un tipo u otro de forma clínica. Por un lado son importantes los factores propios del parásito como son la virulencia y la especie de *Leishmania* causante de la infección. Por otro, factores propios del paciente como son el estado nutricional, la edad y la respuesta inmune tienen una gran importancia (McMahon-Pratt and Alexander 2004).

#### 1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC).

Esta manifestación es la más frecuente y menos grave de las formas clínicas de la enfermedad (McGwire and Satoskar 2014). Esta forma clínica de la leishmaniasis se caracteriza por la aparición de una pápula en el lugar de la picadura del flebótomo, seguida de un proceso de ulceración que termina, al cabo de varios meses, resolviéndose (McGwire and Satoskar 2014). La infección por *L. amazonensis* o *L. aethiopica* puede producir, en algunas ocasiones, una leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) en la que aparecen lesiones nodulares, no ulcerativas y alejadas del lugar de la picadura del flebótomo (Bailey and Lockwood 2007).

#### 1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LM).

Esta forma clínica es causada por algunas especies americanas, principalmente *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Tiempo después de la desaparición de la lesión cutánea, se producen múltiples lesiones en las mucosas bucales y nasales, debido a la diseminación linfática del parásito. Si no se trata, da lugar a mutilaciones del tejido nasal, bucal y/o oro/naso-faríngeo (de Oliveira and Brodskyn 2012). En pacientes inmunodeprimidos se han descrito trastornos similares causados por otras especies causantes de la forma visceral, como *L. infantum* y *L. donovani*.

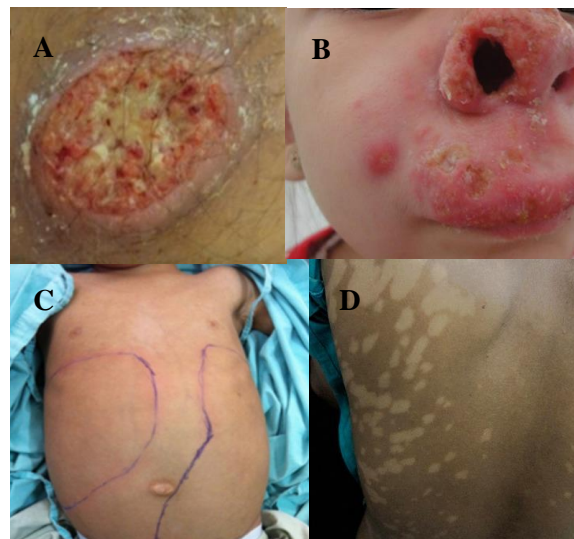
#### 1.2.3 Leishmaniasis visceral (LV).

Es la forma más grave de la enfermedad y está causada por *L. infantum* y *L. donovani*, aunque se han descrito casos en individuos inmunodeprimidos causados por especies que provocan la forma cutánea (Who 2010). Como consecuencia de la invasión de los tejidos por los parásitos hay una afectación principalmente del hígado, el bazo y la

medula ósea, que provoca una disfunción de los mismos (Stanley and Engwerda 2007). La clínica de la enfermedad cursa con fiebre, pérdida de peso, hipergammaglobulinemia, leucopenia y anemia, dando lugar a una alta tasa de mortalidad en ausencia de tratamiento (Faleiro, Kumar et al. 2014). En pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* la esplenomegalia puede no aparecer, dándose con mayor frecuencia otras manifestaciones clínicas atípicas como síntomas gastrointestinales, debilidad, desnutrición y pérdida de peso, además de encontrarse los amastigotes en otros órganos como los pulmones o el intestino (Alexandrino-de-Oliveira, Santos-Oliveira et al. 2010, Hurissa, Gebre-Silassie et al. 2010, Ritmeijer, ter Horst et al. 2011).

#### 1.2.4 Leishmaniasis dérmica post Kala-azar (PKDL).

Esta forma clínica aparece en África oriental e India, y está causada por *L. donovani*. Suele aparecer entre 6 meses a 1 año después de la cura de la leishmaniasis visceral. La característica principal es la aparición de lesiones nodulares, pápulas o máculas hipopigmentadas por toda la superficie de la piel (Zijlstra and el-Hassan 2001). Estos individuos suponen una fuente continua de contagio y son el reservorio principal de la enfermedad en India (Ganguly, Das et al. 2010).



**Figura 1.** Formas clínicas de la leishmaniasis: A) Leishmaniasis cutánea, lesión ulcerativa (Dantas et al., 2013), B) Leishmaniasis mucocutánea, destrucción de las mucosas faciales (Elfaituri et al., 2015), C) Leishmaniasis visceral, paciente con hepatomegalia y esplenomegalia (Sangenis et al., 2014), D) Leishmaniasis dérmica post Kala-Azar, lesiones maculares hipopigmentadas (Zijlstra, 2016).

#### 1.3 Infección asintomática por *Leishmania*

Es cada vez más evidente que la infección por *Leishmania* no produce en todos los casos el desarrollo de manifestaciones clínicas, sino que al contrario el individuo infectado es capaz de permanecer asintomático. Hasta el momento no están definidas las

causas que determinan que unas personas desarrollen síntomas y otras no (Gidwani, Rai et al. 2009), pero la existencia de individuos asintomáticos en zonas endémicas plantea nuevos interrogantes de cara al control de la leishmaniasis. Se estima que por cada caso clínico existen de 4 a 50 individuos asintomáticos, pero este número depende de la zona endémica y el método empleado para su detección, es por ello que la falta de detección de individuos asintomáticos no permite conocer con exactitud la prevalencia real de la infección por *Leishmania* (Evans, Teixeira et al. 1992, Zijlstra, el-Hassan et al. 1994, Schaefer, Kurtzhals et al. 1995, Moral, Rubio et al. 2002) (Bern, Haque et al. 2007).

Hasta la fecha la infección asintomática por *Leishmania* no se encuentra bien caracterizada ya que no existe un test validado para la identificación de estos individuos. Dependiendo de la zona endémica estos individuos se detectan con una prueba específica para *Leishmania* positiva: serológica como el test de aglutinación directa (DAT), molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o celular como el test en piel de leishmanina (LST) (Badaro, Reed et al. 1986, Satti, el Hassan et al. 2002, Hailu, Gramiccia et al. 2009). La población de individuos asintomáticos es heterogénea y cada una de estas aproximaciones reconoce un subgrupo diferente de individuos asintomáticos por lo que es necesario combinarlas para obtener un número real de la prevalencia de infección por *Leishmania*.

El test cutáneo LST es el método que se ha utilizado de manera tradicional para la caracterización y detección de individuos asintomáticos, ya que es fácil de usar en encuestas epidemiológicas y suele ser el método que más casos detecta (Michel, Pomares et al. 2011). En la actualidad, debido a que no existe una producción de leishmanina bajo buenas prácticas de producción (condiciones GMP) el uso de este método no está permitido en la Unión Europea ni en otros muchos países no europeos (Gradoni L 2017. ).

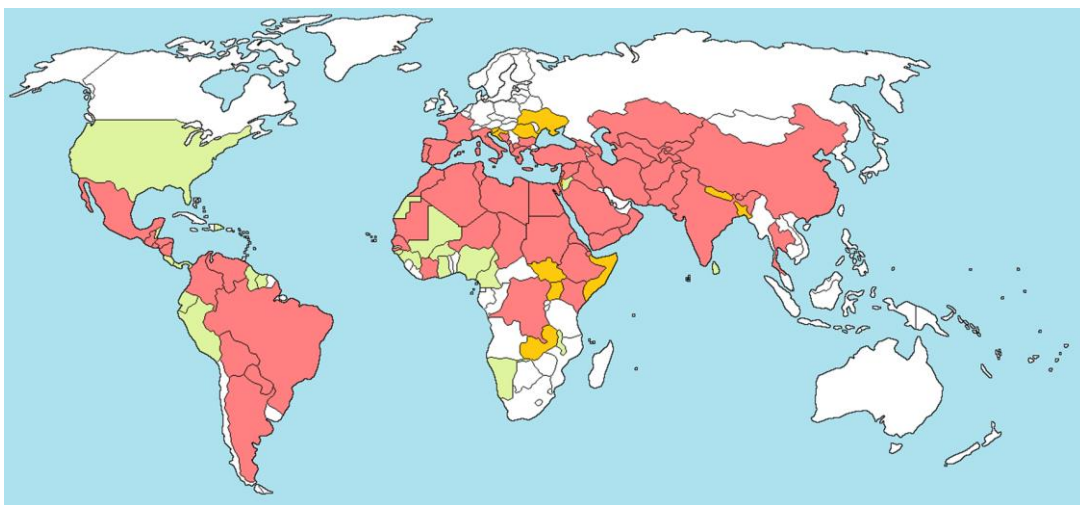
Existe por tanto la necesidad de un test que permita la identificación y caracterización de los sujetos asintomáticos, lo que ayudaría a contestar algunas de las cuestiones fundamentales en la epidemiología de la leishmaniasis y en los programas de control, además de ser incluidos en los ensayos de campo de vacunas contra la leishmaniasis (Singh and Sundar 2014).

## 1.4 Epidemiología de la leishmaniasis

La leishmaniasis es endémica en 98 países de las zonas tropicales y subtropicales y su distribución se encuentra estrechamente ligada a la del vector. La enfermedad afecta aproximadamente a 12 millones de personas y se calcula que unos 350 millones de personas viven en áreas de alta transmisión del parásito (Gradoni L 2017. ).

Anualmente, se dan 1.3 millones de casos nuevos de leishmaniasis en el mundo, predominantemente en la región tropical y subtropical, en las que la enfermedad es endémica. La leishmaniasis cutánea es la manifestación clínica más común, con una incidencia de entre 0.7-1.2 millones de casos nuevos anuales (Alvar, Velez et al. 2012) mientras que la leishmaniasis visceral tiene una incidencia entre 0.2-0.4 millones de casos anuales y da lugar a una mortalidad de entre 20 mil a 40 mil muertes por año.

Según datos de la OMS, el 75% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Afganistán, Brasil, Irán, Irak y Siria; mientras que 90% de los casos de leishmaniasis visceral ocurren en Brasil, India, Bangladesh, Sudán del Sur, Sudán y Etiopía (Gradoni L 2017. ).



**Figura 2.** Distribución geográfica de los casos de leishmaniasis. Rojo: áreas con casos endémicos reportados de LV y LC. Verde: áreas con casos endémicos reportados de LC. Amarillo: áreas con casos endémicos reportados de LV. Imagen propia basada en los datos de 2016 de la OMS.

El impacto real se encuentra limitado debido a que muchas de las infecciones son asintomáticas, sin existir una técnica de referencia validada (Okwor and Uzonna 2016) (Hasker, Malaviya et al. 2014). Además, existe una falta de reporte de los casos en los países más afectados lo que influye en la determinación de la carga real de la enfermedad. Todo esto afecta de manera directa a las estrategias de intervención para el control de la enfermedad (Okwor and Uzonna 2016).

### 1.4.1 La leishmaniasis en Europa

En Europa son endémicas dos especies del parásito: *Leishmania infantum*, presente en las regiones mediterráneas siendo el perro el reservorio principal; y *Leishmania tropica*, presente en Grecia de manera esporádica, siendo de transmisión antroponótica (Savoia 2015).

Tradicionalmente, el 70% de los casos de leishmaniasis en Europa se daban en niños menores de 15 años. Sin embargo entre 1985 y 1995 el 75% de los casos se reportaron en adultos, de los cuales aproximadamente el 60% eran VIH positivos (Alvar 1994, Alvar, Canavate et al. 1997). A finales de los años 90 se observó una clara disminución de los casos de coinfección VIH-*Leishmania* en Europa, que se atribuye a la introducción del uso rutinario de la terapia antirretroviral (TAR) desde 1997 (del Giudice, Mary-Krause et al. 2002, Lopez-Velez 2003, Russo, Nigro et al. 2003).

En la actualidad, la leishmaniasis se considera una enfermedad emergente en Europa (Ready 2010) debido principalmente a la ocurrencia de brotes epidémicos (Christodoulou, Antoniou et al. 2012) y la descripción de casos autóctonos en regiones previamente libres de la enfermedad (Naucke, Menn et al. 2008, Varani, Cagarelli et al. 2013). Este cambio en el patrón de la distribución de la enfermedad se encuentra asociado a los cambios ambientales, al aumento latitudinal de la distribución del vector y a los movimientos y redistribución de los reservorio (Medlock, Hansford et al. 2014, Prudhomme, Rahola et al. 2015, Baylis 2017).

### 1.4.2 La leishmaniasis en España

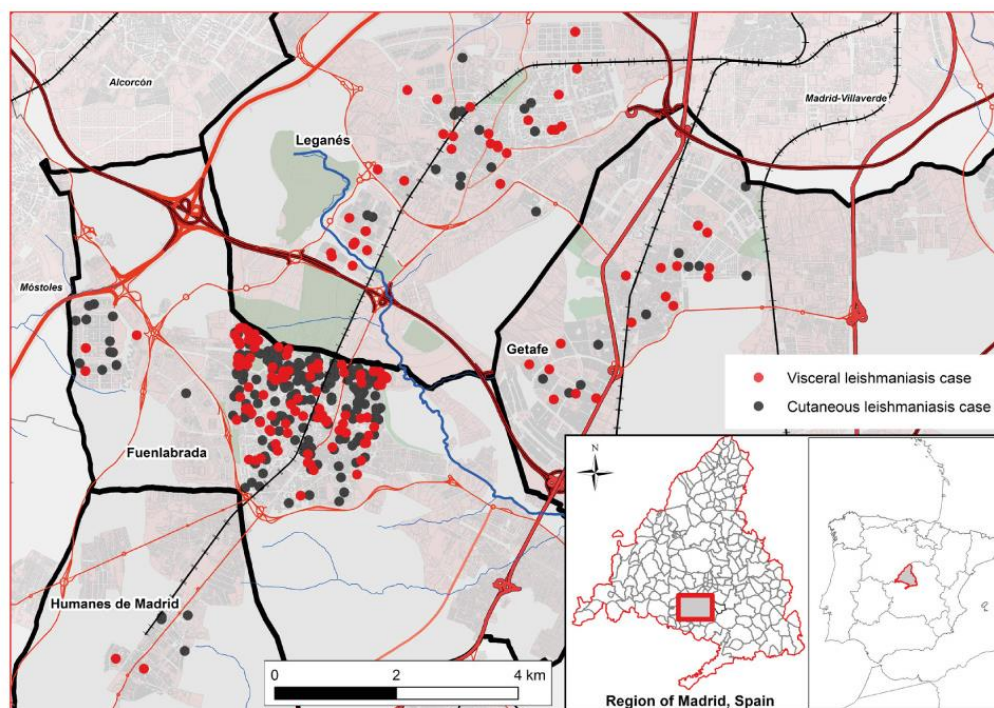
En España la leishmaniasis es endémica en todo el territorio peninsular y las islas Baleares, y está causada por *Leishmania infantum*. España es uno de los países europeos con mayor carga de la enfermedad, tal como ha sido reportado por el programa global de leishmaniasis de la OMS (WHO 2017). Los vectores involucrados en la transmisión del parásito son fundamentalmente *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, cuyos ciclos vitales comprenden de mayo a octubre. Los perros son el principal reservorio de la enfermedad aunque se han encontrado otros mamíferos infectados con el parásito (Who 2010).

El patrón de la enfermedad en España, se ajusta a lo descrito previamente en Europa (Gil-Prieto, Walter et al. 2011). Actualmente la incidencia anual en España es de 0.45 casos/100000 habitantes, dándose la mayoría de los casos en niños menores de 14 años

y en adultos coinfectados con el virus VIH (Suarez Rodriguez, Isidoro Fernandez et al. 2012). Además, cada vez son más frecuentes los casos entre pacientes sometidos a tratamiento inmunosupresor para enfermedades autoinmunes (Antinori, Schifanella et al. 2012).

#### 1.4.2.1 Brote de leishmaniasis de la Comunidad de Madrid

En el año 2009 se detectó un incremento importante de los casos de leishmaniasis en la zona sudoeste de la Comunidad de Madrid, en comparación con la incidencia de años anteriores (Arce, Estirado et al. 2013). Los municipios principalmente afectados fueron: Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución espacial de los casos por lugar de residencia y presentación clínica (rojo LV y negro LC) en la región sudoeste de la Comunidad de Madrid de julio 2009-diciembre 2012 (n=446). Tomado de (Arce, Estirado et al. 2013).

En los datos recogidos desde julio de 2009 hasta finales de 2012 se han descrito 446 infecciones en humanos, de las cuales el 35.9% eran formas viscerales y el 64.1% formas cutáneas, dándose el 70,6% de los casos totales en adultos inmunocompetentes (Carrillo, Moreno et al. 2013). En el año 2011 la incidencia en Fuenlabrada, el municipio más afectado, fue de 44,5 casos/ 100000 habitantes (Remoli, Jimenez et al. 2016).

Dado que el perro es el reservorio natural de *Leishmania infantum*, se realizaron pruebas serológicas para averiguar el papel que jugaban en el brote como reservorio.

Sorprendentemente el porcentaje de animales infectados, en las pruebas realizadas a más de 1.000 perros, estuvo entre el 1,6% y el 2,0%, niveles similares a los que se encontraban en la zona previamente al brote (Miro, Checa et al. 2012).

El estudio parasitológico realizado en las liebres y conejos que se encontraban en los parques cercanos a las zonas en las que se habían descrito los casos humanos, puso de manifiesto que casi el 30% de las liebres capturadas se encontraban infectadas por *Leishmania infantum*. El estudio mediante xenodiagnóstico confirmó el papel de estos animales en la transmisión actuando como reservorio (Molina, Jimenez et al. 2012).

El caso de Fuenlabrada es un buen ejemplo de como la confluencia de diferentes factores como son los cambios ambientales pueden dar lugar a nuevos brotes produciéndose una urbanización del ciclo de la leishmaniasis.

### **1.5 Respuesta inmune frente a la leishmaniasis**

El sistema inmune está compuesto por una red coordinada de células, tejidos y órganos, que son capaces de atacar a los patógenos invasores fundamentalmente de dos maneras: una estrategia primaria de “identificación y destrucción” (inmunidad innata) o mediante la detección específica y la eliminación dirigida con “regulación y memoria” (inmunidad adaptativa) (Doherty 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta inmune frente al parásito es determinante en el progreso de la infección y el desarrollo de la enfermedad. Uno de los mayores problemas en las infecciones por *Leishmania* es la capacidad del parásito de evadir y alterar la respuesta del hospedador. Esta capacidad permite a los parásitos persistir y establecer infecciones crónicas.

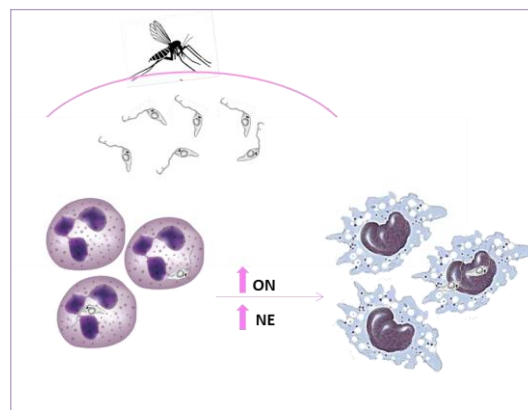
#### **1.5.1 Respuesta inmune innata**

La respuesta inmune innata es fundamental para aclarar rápidamente los patógenos y promover la respuesta inmune adaptativa. Tras la infección, los promastigotes acceden al hospedador donde encuentran los neutrófilos, los macrófagos y los monocitos (Kaye and Scott 2011, Novais, Nguyen et al. 2014).

Los neutrófilos son las primeras células del hospedador en acudir al sitio de la inoculación del parásito unas pocas horas después de la picadura (Peters, Egen et al. 2008). Se ha visto que los neutrófilos engloban promastigotes de *Leishmania* de manera

activa (Mollinedo, Janssen et al. 2010) y producen una variedad de factores microbicidas como el óxido nítrico (ON) o la neutrófilo elastasa (NE) (Charmoy, Megnekou et al. 2007, Ribeiro-Gomes, Moniz-de-Souza et al. 2007) (Figura 6). Sin embargo, los parásitos son capaces de utilizar a los neutrófilos como “caballo de Troya” para la entrada en los macrófagos, donde son capaces de multiplicarse (van Zandbergen, Klinger et al. 2004).

Se ha descrito que la infección de los neutrófilos no solo puede inducir la muerte del parásito, sino que pueden inducir la formación de cuerpos apoptóticos que son capaces de inhibir la respuesta de los macrófagos cercanos (Afonso, Borges et al. 2008).

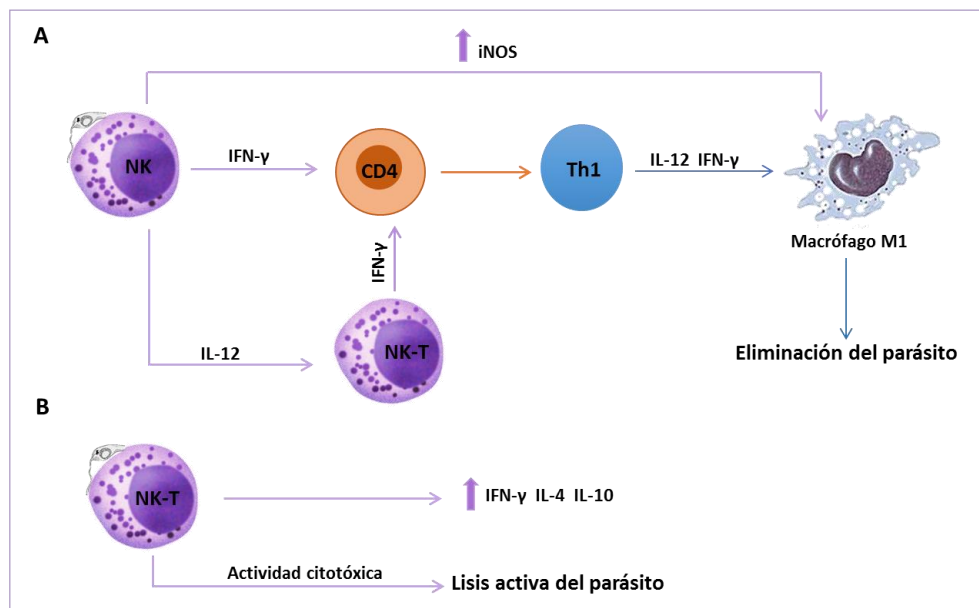


**Figura 6.** Representación esquemática del reclutamiento de los neutrófilos y los macrófagos al lugar de la infección. ON: óxido nítrico. NE: neutrófilo elastasa. Imagen de elaboración propia

Las células natural killer (NK) también son reclutadas al sitio de la infección después de los neutrófilos (Muller, van Zandbergen et al. 2001, Thalhoffer, Chen et al. 2011). Son la fuente primaria temprana de producción de interferón (IFN)- $\gamma$  que favorece la diferenciación de las células T CD4+ y la restricción de la diseminación del parásito (Diefenbach, Schindler et al. 1998). Las células NK también contribuyen a la inducción de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) en macrófagos infectados (Prajeeth, Haeberlein et al. 2011) (Figura 7 A). En humanos, se ha visto que las células NK disminuyen en caso de enfermedad progresiva (Peruhype-Magalhaes, Martins-Filho et al. 2005, Pereira, Dorta et al. 2009), mientras que en lesiones que están curando puede verse un infiltrado de células NK (Pereira, Dorta et al. 2009). Otra vía de activación de las células NK es de manera indirecta mediante la estimulación del receptor tipo Toll (TLR)-2 lo que induce la producción de interleuquina (IL)-12 que a su vez activa las células NK-T (Zamora-Chimal, Hernandez-Ruiz et al. 2017) (Figura 7 A). Esta activación indirecta da lugar a la producción de IFN- $\gamma$  que favorece la diferenciación Th1 de las células T CD4+ (Scharton and Scott 1993).

## Introducción

Las células NK-T son una subpoblación de linfocitos T implicados en la inmunidad innata frente a patógenos. También juegan un papel importante en la respuesta inmune en los estadios tempranos de la infección por *Leishmania* (Ishikawa, Hisaeda et al. 2000, Amprey, Im et al. 2004). La activación de las células NK-T puede darse de manera directa por los glicolípidos del parásito. Esto induce la secreción de diferentes citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) además de aumentar su actividad citotóxica, que media la lisis activa del parásito (Lieke, Nylen et al. 2011) mediante granzimas y perforinas (Figura 7 B).



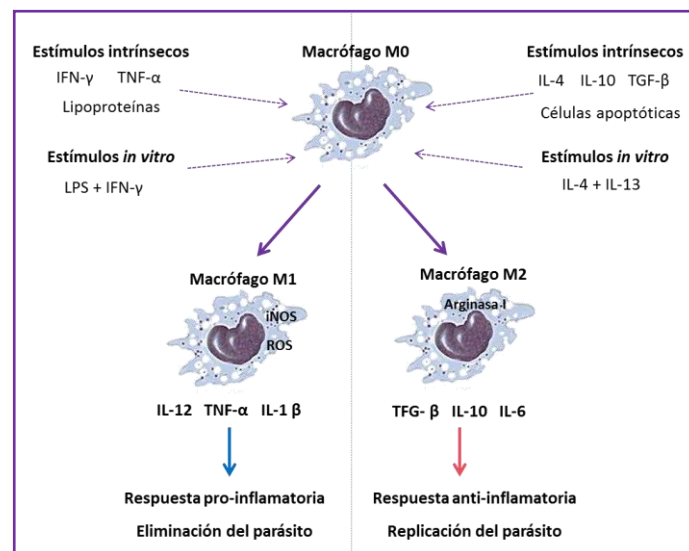
**Figura 7.** Esquema simplificado del papel de las células NK (A) y NK-T (B) en la respuesta inmune innata frente a la infección por *Leishmania*. Imagen de elaboración propia.

Diversos estudios han identificado a los macrófagos como uno de los tipos celulares clave, tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. Su polarización en diferentes fenotipos modula la respuesta y los agrupa de acuerdo a los estímulos percibidos. Esta polarización se encuentra dividida en dos tipos principales: los macrófagos activados de manera clásica o M1, y los macrófagos activados de manera alternativa o M2 (Atri, Guerfali et al. 2018) (Figura 8).

Los macrófagos M1 constituyen una de las primeras líneas de defensa frente a patógenos intracelulares y promueven la polarización Th1 de los linfocitos T CD4+, además de producir citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (Beyer, Mallmann et al. 2012) (Martinez, Gordon et al. 2006, Ambarus, Noordenbos et al. 2012, Italiani, Mazza et al. 2014, Vogel, Glim et al. 2014). A diferencia de los macrófagos M1, los macrófagos M2 tienen actividad moduladora, regulando negativamente las citoquinas

pro-inflamatorias e induciendo la producción de mediadores anti-inflamatorios (Ambarus, Noordenbos et al. 2012, Jaguin, Houlbert et al. 2013).

En la infección por *Leishmania* los macrófagos tienen una doble función que puede parecer contradictoria. Por un lado actúan como célula diana principal del parásito para su replicación, pero también son las células que en última instancia inducen su muerte controlando la infección, lo que hace que estas células sean las principales en la resistencia o susceptibilidad del hospedador (Atri, Guerfali et al. 2018). Los macrófagos M1 debido a la inducción de citoquinas pro-inflamatorias presentan actividad leishmanicida, mientras que los macrófagos M2 presentan actividad anti-inflamatoria que favorecen la supervivencia del parásito (Figura 8) (Liu and Uzonna 2012, Muraille, Leo et al. 2014).



**Figura 8.** Esquema simplificado de la polarización de los macrófagos en función de los estímulos percibidos tras el estudio *in vivo* e *in vitro*. LPS: lipopolisacárido. ROS: especies reactivas de oxígeno. iNOS: óxido nítrico sintetasa. Adaptado de (Atri, Guerfali et al. 2018).

### 1.5.2 Respuesta inmune celular adaptativa

La respuesta inmune celular adaptativa es la respuesta inmune protectora principal frente a la infección por *Leishmania*. Esta respuesta se desarrolla tras la presentación antigénica por parte de las células del sistema inmune innato a los linfocitos T, lo que provoca su proliferación y migración al foco de la inflamación.

Los linfocitos están implicados en la respuesta inmune adaptativa frente a la infección por *Leishmania*, produciendo quimioquinas y citoquinas que inducen la actividad antiparasitaria de los macrófagos. La activación de los linfocitos T CD4+ provoca que se diferencien a linfocitos T colaboradores (Kaye and Scott 2011). Las citoquinas

producidas por estas células determina la respuesta frente a la infección (Figura 9) hacia una respuesta mayoritaria de tipo Th1 (por ejemplo si se produce IL-12) o hacia una respuesta predominante de tipo Th2 (por ejemplo si se produce IL-4) (Himmelrich, Launois et al. 2000).

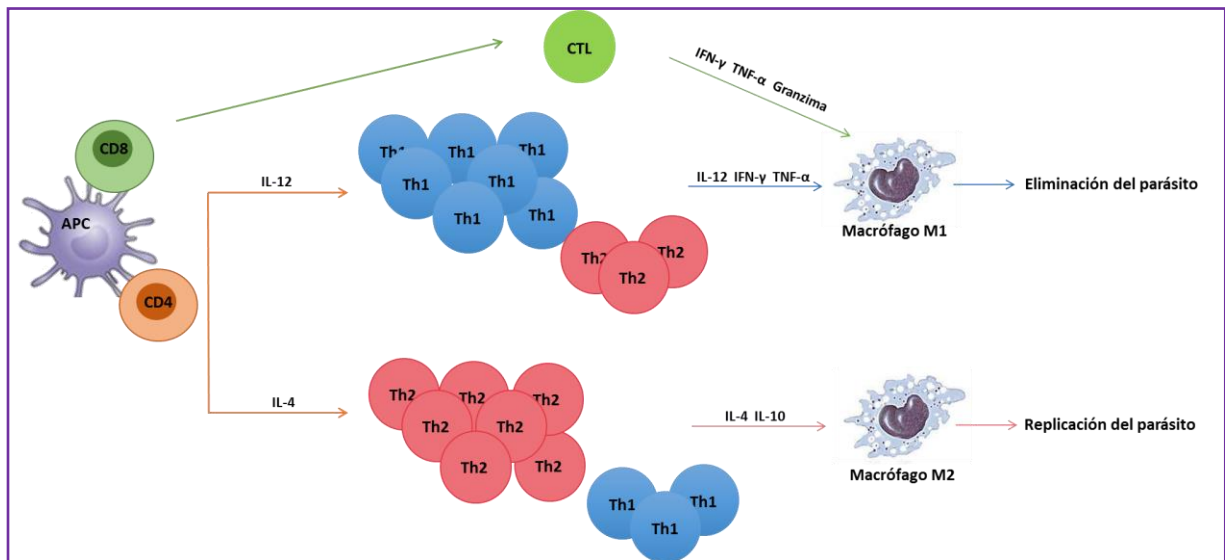
Las citoquinas son mediadores de la señal celular, que afectan a la función celular de manera autocrina, paracrina o endocrina. Las citoquinas son importantes durante todo el proceso de infección por *Leishmania*, siendo fundamentales en la respuesta inmune adquirida (Cecilio, Perez-Cabezas et al. 2014).

En la infección por *Leishmania*, la producción mayoritaria de IL-12 por macrófagos y células dendríticas se asocia con la resistencia frente al parásito. Esta citoquina induce la maduración de las células T hacia un fenotipo tipo Th1 productor de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente IFN- $\gamma$ , IL-2 y factor de necrosis tumoral(TNF)- $\alpha$ , que inducen la activación de macrófagos M1 (Figura 9) y la posterior eliminación de los parásitos mediante la producción de óxido nítrico (ON) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kaye and Scott 2011, Diaz-Gandarilla, Osorio-Trujillo et al. 2013)(Figura 9).

Las citoquinas tipo Th2, como la IL-4 y la IL-10, se han relacionado con la susceptibilidad frente a la leishmaniasis activa y su progresión mediante la inducción de macrófagos de fenotipo M2 (Figura 9) (Gautam, Dixit et al. 2011, Mia, Warnecke et al. 2014). La IL-10 es una citoquina reguladora importante que inhibe la fagocitosis y afecta a la capacidad de los macrófagos para matar los parásitos intracelulares, contribuyendo a su crecimiento y diseminación (Gautam, Dixit et al. 2011). Se han encontrado elevados niveles de IL-10 en el suero, aspirado esplénico, ganglios linfáticos y médula ósea de pacientes con LV (Kenney, Sacks et al. 1998, Nysten and Sacks 2007, Ansari, Kumar et al. 2011), también se produce tras la estimulación de sangre completa con antígenos de *Leishmania* en pacientes con la enfermedad activa, disminuyendo significativamente tras la cura (Singh, Stober et al. 2012). La neutralización de la IL-10 aumenta la producción de IFN- $\gamma$  en ensayos de sangre completa y promueve el aclaramiento de los amastigotes en cultivo de esplenocitos de pacientes con LV (Gautam, Dixit et al. 2011, Singh, Stober et al. 2012)

De forma resumida puede decirse que para que la respuesta inmune celular frente al parásito sea exitosa se necesita un equilibrio entre el conjunto de citoquinas secretadas en la respuesta celular. Esto requiere un reconocimiento antigénico por las células

presentadoras de antígeno, y a la producción de citoquinas diferenciadoras de tipo Th1, que da lugar a la activación de los macrófagos M1 (Soong, Henard et al. 2012). También es necesario que la respuesta sea autolimitada, finalizando con la activación de células tipo Th2, que mayoritariamente secretan IL-10 y bloquean la producción de óxido nítrico (Alexander and Brombacher 2012).



**Figura 9.** Esquema simplificado de la respuesta inmune adaptativa frente a la infección por *Leishmania*. Cuando la respuesta es predominante de tipo Th1 se induce la eliminación del parásito frente a la replicación que se favorece cuando la respuesta es predominantemente de tipo Th2. Imagen de elaboración propia.

Las células Th17 representan una subpoblación de las células T CD4+ efectoras distintas del linaje Th1 y Th2, que producen citoquinas pro-inflamatorias e inducen el reclutamiento de leucocitos, especialmente de neutrófilos, creando una unión entre la inmunidad innata y la adaptativa (Tesmer, Lundy et al. 2008). La IL-17 es producida mayoritariamente por las células Th17 y colaboran con otras citoquinas, como la IL-17F o la IL-22, secretadas por las células Th17 para inducir inflamación tisular (Korn, Bettelli et al. 2009).

Existen evidencias recientes que sugieren el importante papel protector de las células Th17 durante la LV. El papel efector de la IL-17A está mediado por la acumulación de neutrófilos y la mejora de la secreción de IFN- $\gamma$ . Ratones deficientes en el receptor A de la IL-17 son más susceptibles a la infección por *L. infantum*, presentando un menor número de células T CD4+ productoras de IFN- $\gamma$  (Nascimento, Carregaro et al. 2015). Además, se ha descrito que la expresión de citoquinas Th17 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) es mayor en el estado asintomático que en casos de LV activa (Pitta, Romano et al. 2009, Ghosh, Sharma et al. 2013).

La inmunidad celular mediada por células T CD8<sup>+</sup> durante la LV ha sido menos estudiada que la respuesta T CD4<sup>+</sup>. Las células T CD8<sup>+</sup> responden a la producción de IL-12 y el IFN tipo I, lo que promueve la expresión de diferentes citoquinas como TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  y de moléculas citotóxicas como granzimas y perforinas que permiten a las células T CD8<sup>+</sup> realizar su función efectora (Figura 9) (Kaech and Cui 2012). El paradigma actual indica que las células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  contribuyen a la respuesta protectora frente al parásito mientras que la citotoxicidad mediada por estas células conduce a la patología en el tejido y promueve la ulceración de la piel (Novais, Carvalho et al. 2013, Santos Cda, Boaventura et al. 2013).

### 1.5.3 Respuesta inmune humoral

La respuesta humoral se encuentra mediada por células B y anticuerpos que se consideran de modesta importancia en la inmunidad protectora frente a la LV. Es más, la hipergammaglobulinemia presente en pacientes con LV se correlaciona positivamente con la gravedad de la enfermedad y disminuye en el tiempo tras la cura farmacológica (Cooper, Rein et al. 1946, da Matta, Hoshino-Shimizu et al. 2000, Miles, Conrad et al. 2005).

En los pacientes con LV se ha visto una producción elevada de inmunoglobulinas como resultado de la activación policlonal de las células B (Galvao-Castro, Sa Ferreira et al. 1984) que producen anticuerpos específicos y no específicos frente al parásito (Evans, Krug et al. 1989). Además, se ha descrito que, dependiendo de la subclase de los anticuerpos IgG, y del receptor Fc al que se unan, pueden inducirse respuestas pro-inflamatorias o antiinflamatorias (Woelbing, Kostka et al. 2006, Gallo, Goncalves et al. 2010, Guilliams, Bruhns et al. 2014).

Las células T colaboradoras foliculares (Tfh) son una subpoblación de los linfocitos T que se encuentran en el bazo y los ganglios linfáticos (Ma, Deenick et al. 2012, Ballesteros-Tato and Randall 2014). Las células Tfh promueven la diferenciación de las células B en células B de memoria o en células plasmáticas generadoras de anticuerpos (Rodrigues, Laforge et al. 2014). También se ha descrito la migración de esta población celular a los folículos y los centros germinales, donde inducen la supervivencia de células B y señales de diferenciación en células plasmáticas o de memoria (Ballesteros-Tato and Randall 2014).

#### 1.5.4 Respuesta inmune en la coinfección VIH-*Leishmania*

En los pacientes con VIH, la carga antigénica que supone la replicación del virus desencadena la activación del sistema inmune, la diseminación viral y la muerte de las células infectadas. Paralelamente, el timo y otros componentes del sistema linfóide como la médula ósea se deterioran, con lo que se pierde la capacidad de reponer las células (Hadrup, Strindhall et al. 2006). Se ha visto que la terapia antirretroviral revierte parcialmente las rutas pro-inflamatorias, pero la inflamación se mantiene de forma indefinida, al igual que la presencia de distintos marcadores de inflamación (VIH en España 2017).

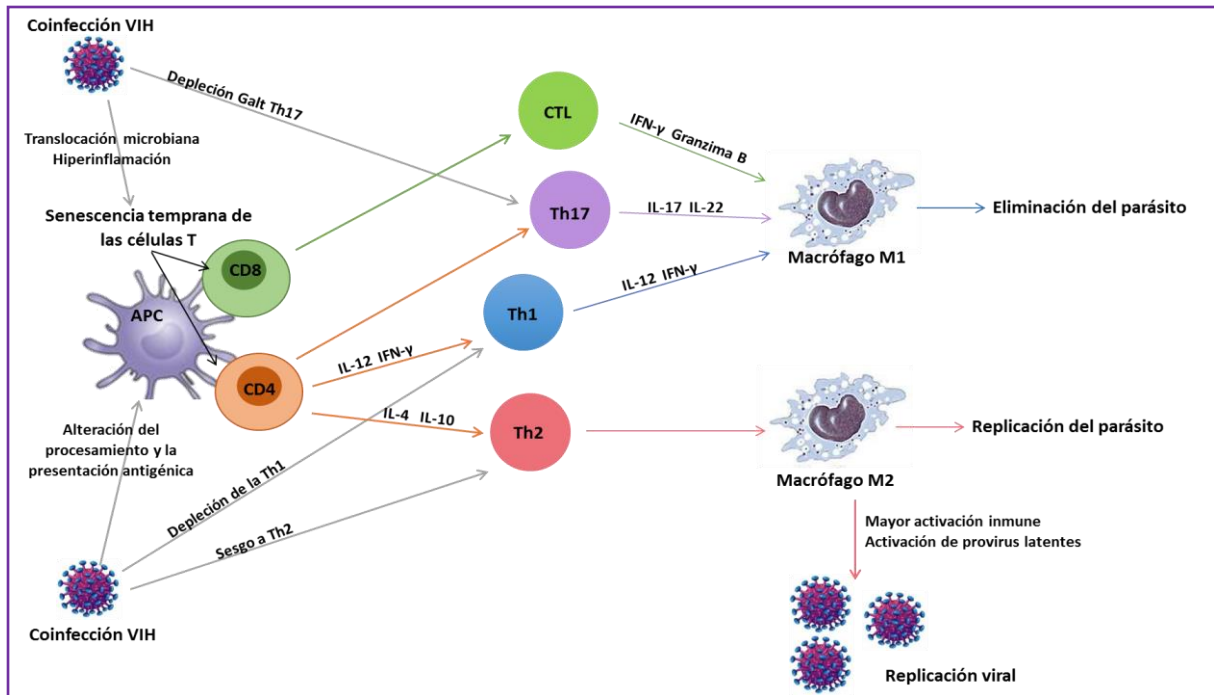
En los pacientes coinfectados con VIH y *Leishmania*, los macrófagos representan un reservorio común para el virus y el parásito, sirviendo como vehículo para diseminar ambos a través del hospedador (Olivier, Badaro et al. 2003). Además, ambos patógenos pueden interactuar entre ellos a nivel celular para exacerbar la supresión inmune.

La infección concomitante por dos patógenos inmunosupresores deriva en una incapacidad persistente del sistema inmunitario, favoreciendo un estado de anergia inmunológica, que en última instancia resulta fatal para el paciente coinfectado (Adriaensen, Dorlo et al. 2017).

El VIH-1 provoca además, un desajuste general de la inmunidad mediada por células con bajos niveles de linfocitos T CD4+, las células protectoras principales frente a la leishmaniasis. También se ha visto que la infección por el virus sesga la inmunidad del hospedador hacia una respuesta tipo Th2, que en el caso de los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* favorece la replicación del parásito y la activación de provirus latentes (Figura 10) (Adriaensen, Dorlo et al. 2017).

En los pacientes VIH+, la depleción de las células Th17 del tejido linfóide asociado al intestino junto con una serie de eventos inmunológicos que ocurren a nivel gastrointestinal provocan traslocación microbiana (Brenchley, Price et al. 2006). Esta traslocación microbiana produce una activación inmune continua, que es uno de los factores que da lugar a la senescencia y al agotamiento de las células T en estos pacientes, que puede debilitar aún más la respuesta inmune protectora frente a *Leishmania* (Figura 10) (Desai and Landay 2010). La activación inmune crónica también se ha asociado con recaídas de leishmaniasis visceral en los pacientes VIH+ (Silva-Freitas, Cota et al. 2016).

Se ha demostrado que los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*, tras el tratamiento de la leishmaniasis visceral, son capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora frente al parásito (Castro, Carrillo et al. 2016) (Figura 10). Sin embargo después de la remisión clínica, la parasitemia también puede persistir, al menos de forma intermitente (Bourgeois, Bastien et al. 2010). Se ha descrito un curso crónico/intermitente de LV que dura varios años, denominado leishmaniasis visceral crónica activa (LVAC) (Bourgeois, Bastien et al. 2010).



**Figura 10.** Resumen de los mecanismos sinérgicos que median en la inmunidad de células T frente a *Leishmania* debido a la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que incita a la replicación viral y parasitaria persistente en pacientes coinfectados. APC: célula presentadora de antígeno. CTL: célula T citotóxica. Adaptado de (Adriaensen, Abdellati et al. 2018).

### 1.5.5 Agotamiento celular

En los últimos años, se han desarrollado estudios que relacionan la persistencia de algunas infecciones víricas y parasitarias con la presencia de linfocitos T “agotados” (Yi, Cox et al. 2010, Gigley, Bhadra et al. 2012, Rodrigues, Laforge et al. 2014). El agotamiento inmune corresponde a una pérdida de la función efectora de las células T que ocurre de manera progresiva, comenzando con una disminución de la capacidad proliferativa, la producción de IL-2 y la función citotóxica, seguida de una incapacidad para producir IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Jin, Jeong et al. 2011, Wherry 2011).

Se ha descrito que en la leishmaniasis visceral humana, las células T CD8<sup>+</sup> efectoras productoras de IFN- $\gamma$  se encuentran ausentes (Gautam, Kumar et al. 2014). Estas células expresan elevados niveles de antígeno 4 citotóxico de linfocitos T (CTLA-4) y de la

proteína de muerte programada (PD1) (Gautam, Kumar et al. 2014), reguladores negativos de la activación de células T asociados con la anergia celular y el agotamiento (Chen 2004). En relación a la producción de PD1, se han obtenido resultados similares por Esch y colaboradores, estudiando tanto células T CD4+ como T CD8+, en casos de leishmaniasis visceral canina (Esch, Juelsgaard et al. 2013).

## **1.6 Diagnóstico de la leishmaniasis**

Los síntomas clínicos asociados con la leishmaniasis no son específicos de esta enfermedad, por lo que es necesario que el diagnóstico se acompañe de técnicas inmunoparasitológicas específicas. Además, dependiendo de la región geográfica donde se detecte debe considerarse el diagnóstico diferencial con otras patologías para su confirmación.

El diagnóstico de la leishmaniasis se hace mediante una combinación de la información anamnésica con las manifestaciones clínicas y el diagnóstico de laboratorio. No hay un test “gold standard” para el diagnóstico de laboratorio, que se basa en los siguientes criterios: una parasitología positiva con la demostración de la presencia del parásito o su ADN o la detección de elevados títulos de anticuerpos circulantes específicos (en el caso del diagnóstico de LV).

### **1.6.1 Detección directa del parásito**

El diagnóstico de certeza de la leishmaniasis se realiza por la observación directa de los amastigotes en tejidos o aislando los promastigotes en cultivo. La microscopía es de fácil manejo pero requieren un entrenamiento adecuado.

El empleo de medios monofásicos (Schneider, M199 o medio Grace) o difásicos (Novy-McNeal-Nicolle y medio Evans modificado) para el cultivo, ha demostrado ser una técnica específica, sin embargo es tediosa, necesita personal especializado y normalmente se restringe a centros de referencia y hospitales (Srividya, Kulshrestha et al. 2012).

En los casos de LV este método tiene una sensibilidad que varía desde el 64% al 94% tanto en pacientes inmunocompetentes como en coinfectados con el VIH (Murray, Berman et al. 2005).

### **1.6.2 Inmunodiagnóstico / diagnóstico serológico**

Distintos antígenos se han utilizado para la detección de anticuerpos específicos anti-*Leishmania*. En la LC la producción de anticuerpos es muy escasa al tratarse de una infección localizada. Por lo tanto, los test serológicos se utilizan principalmente en el diagnóstico de LV y, por lo general tienen una alta sensibilidad aunque su especificidad es variable (Who 2010, Abubakar, Ruiz-Postigo et al. 2014). En los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*, la sensibilidad de las técnicas es menor, ya que la determinación de anticuerpos es difícil debido a la anergia inmunitaria producida por el virus (Deniau, Canavate et al. 2003, Savoia 2015).

Debido a que los anticuerpos pueden detectarse durante meses e incluso años en los pacientes, los métodos basados en su detección no diferencian entre las infecciones activas, pasadas o las recaídas. Además, en áreas endémicas una proporción variable de individuos sanos pueden ser positivos a estos test debido a su condición de asintomáticos (Silva, Madeira et al. 2011).

#### **1.6.2.1 Test de aglutinación directa (DAT)**

El ensayo DAT es un test semi-cuantitativo que ha sido validado en diferentes áreas endémicas y que puede utilizarse con muestras de suero, plasma y sangre completa (Moody and Chiodini 2000, Chappuis, Rijal et al. 2006, Srividya, Kulshrestha et al. 2012). Tiene la ventaja de que detecta bajos títulos de anticuerpos debido al mosaico de antígenos que usa, sin embargo algunos de ellos pueden dar reacciones cruzadas (Maia, Lirio et al. 2012).

#### **1.6.2.2 Test de inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

El test de inmunofluorescencia indirecta se basa en la detección de anticuerpos que aparecen en estadios tempranos de la infección y que pueden permanecer detectables varios meses tras el tratamiento. Esta técnica presenta una sensibilidad entre el 87 y el 100% y una especificidad entre el 77 al 100%. Esta sensibilidad es mucho menor en pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* (Antinori, Schifanella et al. 2012, van Griensven, Carrillo et al. 2014). Se ha reportado reactividad cruzada en pacientes con tripanosomiasis, malaria, tuberculosis, brucelosis y fiebre tifoidea (Kohanteb and Ardehali 2005, Elmahallawy, Sampedro Martinez et al. 2014). A pesar de que es necesario un microscopio de fluorescencia y un laboratorio relativamente bien

equipado, el IFI continúa siendo la técnica serológica “gold standard” (Cota, de Sousa et al. 2013).

### **1.6.2.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

El ensayo ELISA se ha utilizado como método para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas, incluida la leishmaniasis (Sundar and Rai 2002). La sensibilidad y especificidad de la técnica depende del antígeno que se utilice (Srividya, Kulshrestha et al. 2012, de Paiva-Cavalcanti, de Moraes et al. 2015). Uno de los antígenos más comúnmente utilizados es el antígeno crudo soluble (Sundar and Rai 2002). Empleando este antígeno, la sensibilidad y especificidad de la técnica va del 80 al 100% y del 84 al 100% respectivamente, aunque también se han descrito reacciones cruzadas (Sundar and Rai 2002, Elmahallawy, Sampedro Martinez et al. 2014). En pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* se han reportado sensibilidades algo menores (79-89%) (Deniau, Canavate et al. 2003).

### **1.6.2.4 Test inmunocromatográfico**

Las tiras inmunocromatográficas rápidas están basadas en el antígeno recombinante rk39. El rk39 es un test rápido, no invasivo y coste efectivo que ha demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad, dependiendo de la zona endémica de estudio. También se ha utilizado en el serodiagnóstico de pacientes VIH+ coinfectados; sin embargo, presenta una menor sensibilidad que dificulta el diagnóstico de LV en estos pacientes (Cota, de Sousa et al. 2013).

### **1.6.3 Diagnóstico molecular**

Las técnicas moleculares han ido incrementando su relevancia en los últimos años, ya que han permitido superar algunos de los inconvenientes y desventajas de los métodos clásicos. Estas técnicas mejoran la sensibilidad diagnóstica en los casos de LC y permiten el uso de procedimientos menos invasivos para el diagnóstico de los casos de LV (como el análisis de sangre periférica en lugar de aspirado de médula ósea) (Weigle, Labrada et al. 2002, de Ruiter, van der Veer et al. 2014).

#### **1.6.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de segmentos específicos del ADN. Tanto en pacientes inmunocompetentes como en

pacientes inmunodeprimidos, la PCR en sangre o medula ósea presenta una alta sensibilidad (de Ruiters, van der Veer et al. 2014).

Diferentes secuencias se han utilizado como diana de la PCR incluyendo el ADN del kinetoplasto, ARN ribosomal, la glicoproteína 63 (gp63) o las regiones transcritas espaciadoras internas (ITS) (Suarez, Valencia et al. 2015).

### **1.6.3.2 PCR cuantitativa (qPCR)**

La PCR cuantitativa (qPCR) presenta ventajas frente a la PCR convencional ya que reduce el tiempo necesario para el desarrollo de la técnica además de permitir la cuantificación de la carga parasitaria en las muestras clínicas (Cruz, Millet et al. 2013).

### **1.6.3.3 Otras técnicas moleculares de diagnóstico**

Se han introducido nuevas técnicas moleculares como la Amplificación Basada En Secuencia De Ácido Nucleico (NASBA, de sus siglas en inglés) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, de sus siglas en inglés) para la detección de ARN y ADN de *Leishmania*.

La técnica NASBA es una herramienta potente, basada en la detección de ARN, que combina una alta sensibilidad y especificidad pudiendo utilizarse varios tipos de muestras poco invasivas (Basiye, Mbuchi et al. 2010, Mugasa, Deborggraeve et al. 2010).

La técnica LAMP tiene la ventaja de amplificar ADN con rápida y alta especificidad en condiciones isotérmicas. LAMP ha sido desarrollada como una alternativa a la PCR, ya que es más rápida y sensible, teniendo buen potencial para la aplicación en campo (Verma, Singh et al. 2013, Mikita, Maeda et al. 2014).

### **1.6.4 Detección de antígeno**

Los test de detección de antígeno de *Leishmania* ofrecen una alternativa a las técnicas de detección de anticuerpos, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (Riera, Fisa et al. 2004, Canavate, Herrero et al. 2011). Teóricamente, son métodos más específicos que los test de detección de anticuerpos, ya que evitan reacciones cruzadas y pueden distinguir mejor las infecciones pasadas (Chappuis, Sundar et al. 2007). Sin embargo, las muestras de suero no es la mejor muestra clínica, ya que diferentes factores inmunológicos pueden cubrir determinantes antigénicos o inhibir de manera competitiva la unión de los anticuerpos al antígeno libre (Canavate, Herrero et al. 2011).

El test de aglutinación para la detección de antígeno en orina (KAtex), es un test simple, no invasivo, rápido y fácil de usar para el diagnóstico de la LV basado en la detección del glicoconjugado de bajo peso molecular (5-20 kD) en la orina de los pacientes (Ahsan, Islam et al. 2010). El antígeno puede detectarse desde un mes hasta seis meses después del tratamiento (Riera, Fisa et al. 2004). El métodos KAtex muestra un valor predictivo positivo (Sundar, Agrawal et al. 2005), alta especificidad de 82-100% y una sensibilidad variable del 47-95% (Elmahallawy, Sampedro Martinez et al. 2014). En inmunodeprimidos, se ha reportado una sensibilidad y una especificidad de 85-100% y del 96-100% respectivamente (Canavate, Herrero et al. 2011).

Recientemente se ha aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) un nuevo test para el diagnóstico *in vitro* de leishmaniasis cutánea. La prueba rápida CLDetect™ para LC, es un inmunoensayo cualitativo basado en membrana para la detección del antígeno peroxidoxina -presente en los amastigotes- a partir de muestras tomadas de las lesiones cutáneas de los pacientes (De Silva, Somaratne et al. 2017, Schallig, Hu et al. 2019).

### **1.6.5 Diagnóstico celular**

Se ha descrito previamente la importancia de la respuesta celular tipo Th1 para la cura de la leishmaniasis. Es por ello que en los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas que permiten detectar y caracterizar esta respuesta inmune. En la LV, la respuesta celular específica frente al parásito aparece tras el tratamiento, por lo que no puede usarse para el diagnóstico, pero resulta de utilidad para establecer la cura de los pacientes y su inmunidad. También se han utilizado para estudios de prevalencia de la infección asintomática.

#### **1.6.5.1 Test en piel de leishmanina o Test de Montenegro**

El test en piel de leishmanina (LST) se basa en la inoculación de parásitos fenolizados por vía intradérmica, lo que provoca la inducción de una respuesta inmune celular. La prueba es positiva cuando la reacción específica a la leishmanina da lugar a una induración con diámetro mayor o igual a 5 mm, y es negativa cuando no se observa lo anterior. La falta de condiciones GMP para su producción hace que su utilización se vea restringida a unos pocos países, utilizándose fundamentalmente en estudios epidemiológicos de infección asintomática.

### 1.6.5.2 Ensayo de estimulación de sangre completa

En los últimos años se ha desarrollado y optimizado la utilización del ensayo de estimulación de sangre completa para los casos de LV, utilizando antígeno soluble de *Leishmania* (Gidwani, Jones et al. 2011, Katara, Ansari et al. 2012, Singh, Stober et al. 2012). El test se basa en el principio de que las células T de muestras de sangre completa, cuando son expuestas e incubadas con antígenos específicos de *Leishmania* son capaces de producir IFN- $\gamma$ , permitiendo detectar la respuesta inmune adaptativa del hospedador frente al patógeno *ex vivo* (Singh and Sundar 2014). Varios estudios recientes han demostrado que utilizando este ensayo midiendo otras citoquinas y quimioquinas relacionadas con la respuesta Th1 también es posible establecer la cura de casos de LV (Ibarra-Meneses, Mondal et al. 2017). También se ha demostrado que este ensayo es útil para la detección de individuos asintomáticos en zonas endémicas de *L. infantum* y *L. donovani* (Ibarra-Meneses, Carrillo et al. 2016, Ibarra-Meneses, Ghosh et al. 2017).

### 1.6.5.3 Ensayo de proliferación celular *in vitro*

La proliferación de linfocitos de sangre periférica es una técnica bien conocida para medir la inmunidad mediada por células estimulas *in vitro* con antígenos del patógeno, aunque se ha utilizado de manera limitada en el estudio de enfermedades infecciosas (Singh and Sundar 2014).

El estudio de la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) frente a antígenos de *Leishmania* es una herramienta útil para la evaluación de la inmunidad celular de los pacientes con LV. En pacientes inmunocompetentes se ha visto que una respuesta linfoproliferativa positiva frente al antígeno soluble de *Leishmania* (SLA) es un marcador de recuperación tras la infección y un signo del desarrollo de una respuesta específica de memoria frente al parásito (Peruhype-Magalhaes, Martins-Filho et al. 2005). Además, se ha demostrado que la respuesta linfoproliferativa frente al antígeno SLA es una herramienta útil para la detección de individuos inmunocompetentes asintomáticos (Ibarra-Meneses, Carrillo et al. 2016).

## 1.7 Tratamiento

Uno de los mayores retos en la leishmaniasis es encontrar un tratamiento efectivo que no solo resuelva el primer episodio de leishmaniasis visceral sino que prevenga las

recaídas, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos. El tratamiento de los pacientes depende de las recomendaciones específicas de cada región y está basado en la quimioterapia antiparasitaria (Who 2010).

Desde finales de los años 40 se han venido utilizando antimoniales pentavalentes para el tratamiento de la LV (Pentosam® (SSG) y Glucantime® (MA)), sin embargo presentan una alta toxicidad y mayores tasas de mortalidad en malnutridos y coinfectados con el VIH. Además en los últimos años se ha dado un incremento de las cepas de parásitos resistentes a estos fármacos (Hefnawy, Berg et al. 2017).

En India el uso de la SSG se extendió para el tratamiento alternativo de la LV. Debido a su baja eficacia, su toxicidad, los efectos secundarios y la disponibilidad de otras opciones terapéuticas su uso se ha visto disminuido (Jha, Singh et al. 1991). Sin embargo, se utiliza para mantener la profilaxis secundaria en pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*.

Un problema fundamental que presentan los tratamientos es la vía de administración, ya que todos, a excepción de la miltefosina que es el primer tratamiento oral efectivo disponible para la LV, se administran por vía parenteral, lo que dificulta la adhesión de los pacientes al tratamiento (Sundar, Jha et al. 2006). Sin embargo, cabe destacar que el uso actual de la anfotericina B liposomal (L-AmB) (AmBisome®) suministrada en dosis única está resultando clave en el control de la enfermedad en la India (Singh, Singh et al. 2016).

En la actualidad, estos fármacos están siendo administrados de manera conjunta con otros (McGwire and Satoskar 2014). Combinando una única dosis de 5 mg/kg de L-AmB con miltefosina durante 7-14 días; una única dosis de 5 mg/kg de L-AmB con 15 mg/kg/día de paramomicina durante 10 días; o combinando miltefosina con paramomicina ambas durante 10 días, se han llegado a obtener tasas de cura similares a las alcanzadas con tratamientos más largos administrando un único fármaco (Gradoni L 2017. ).

Con respecto a la LC no es posible, o alcanzable a corto plazo, recomendar un régimen de tratamiento único que sea seguro y efectivo para todas las formas de LC. Para cada paciente la decisión terapéutica debe basarse en la relación riesgo-beneficio.

De manera general, en los casos de LC la elección del tratamiento depende de seis características: el tamaño de la lesión, el número de lesiones, el lugar de la lesión, la existencia de condiciones preexistentes (como comorbilidades, edad avanzada o inmunosupresiones), la duración esperada y la especie del parásito causante.

Los antimoniales pentavalentes (SSG y MA) son el tratamiento de elección para el tratamiento de la LC y la LM, administrados de manera intravenosa o intramuscular a una dosis de 20 mg/kg/día durante 20 días (Tuon, Neto et al. 2008). Por otro lado, la crioterapia es una modalidad terapéutica recomendada por la OMS para el tratamiento de la LC en el Viejo Mundo utilizada o no en combinación con la administración intralesional de antimoniales pentavalentes (Who 2010)

Se define la inmunoterapia como el uso de moléculas biológicas o compuestos farmacológicos para modular la respuesta inmune o en combinación con los tratamientos (Roatt, Aguiar-Soares et al. 2014). En el caso de la leishmaniasis, cada vez está más claro que la inmunidad del hospedador es un factor crítico que determina la respuesta al tratamiento y el control de la leishmaniasis visceral, actuando sinérgicamente con los tratamientos anti-*Leishmania* (Adriaensen, Dorlo et al. 2017). A pesar de que varios medicamentos se encuentran en desarrollo, no hay agentes inmunoterapéuticos o vacunas frente a la leishmaniasis registradas para su uso en humanos (Richardus 2015, Richardus and Oskam 2015).

### **1.8 Leishmaniasis e inmunosupresión**

La inmunosupresión es considerada el principal factor de riesgo individual para el desarrollo de la forma clínica de la leishmaniasis visceral, pudiendo alterar la presentación de la enfermedad y la respuesta frente al tratamiento.

De manera general, la inmunosupresión inmunológica más extendida ha sido la causada por la infección por el VIH y en consecuencia es en estos pacientes en los que más se ha estudiado la coinfección con *Leishmania*. Sin embargo, el actual aumento de la administración de fármacos inmunosupresores, ha hecho que incrementen los casos de infecciones por *Leishmania* en estos pacientes.

#### **1.8.1 Coinfección VIH-*Leishmania***

Según los datos de ONU SIDA, a fecha de junio de 2016 en torno a 36.7 millones de personas se encontraban infectadas con el VIH. En España se estima que existen

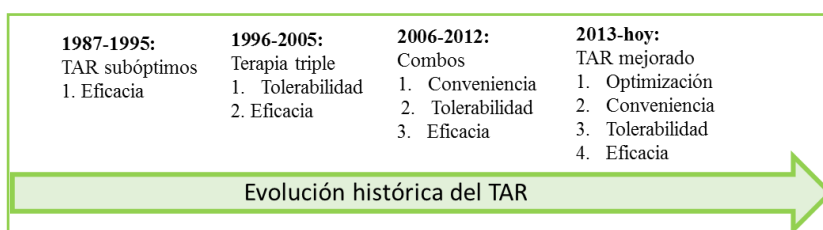
150.000 personas infectadas por el VIH, de las cuales se calcula que el 25% se encuentran sin diagnosticar, lo que arroja una prevalencia en la población general adulta del 0.4% (del Amo J, 2015).

La infección por el VIH durante los años 80 y primera mitad de los años 90 se extendió rápidamente entre usuarios de drogas intravenosas (UDI). En los últimos 15 años el mecanismo de transmisión más frecuente ha variado, siendo la vía sexual, fundamentalmente entre hombres que tienen sexo con hombres, la forma mayoritaria de adquisición (del Amo J, 2015).

La población con infección por VIH experimenta cambios inmunológicos que se producen como consecuencia de un estado basal de activación inmune e inflamación persistente que llevan al envejecimiento del sistema inmune de forma precoz, conocido como inmunosenescencia (Hadrup, Strindhall et al. 2006).

La inmunosenescencia contribuye al envejecimiento en la medida en que se asocia a un aumento en la liberación de mediadores inflamatorios. Hay una expansión de linfocitos T CD8+ específicos frente al virus y la inversión del cociente CD4/CD8 (Serrano, Araujo et al. 2014).

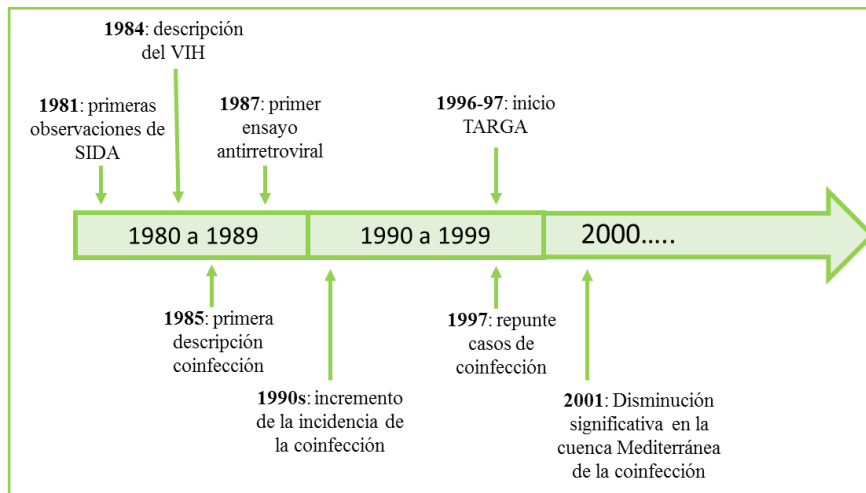
El tratamiento antirretroviral ha alcanzado un éxito incuestionable en su objetivo de suprimir el control de la replicación virológica y disminuir la aparición de infecciones oportunistas en pacientes infectados por el VIH. No obstante, las personas infectadas por el VIH tienen una esperanza de vida menor que la de la población general de similares características. Además el tratamiento no es curativo, lo que significa que un individuo que adquiere la enfermedad tendrá que estar sometido al mismo durante toda su vida.



**Figura 11.** Evolución histórica de los requisitos de la terapia TAR desde los primeros años en los que predominaba la eficacia sobre cualquier requisito a la actualidad en la que se valora la conveniencia, la tolerabilidad del paciente y la optimización del tratamiento. Imagen de elaboración propia.

El primer caso de coinfección VIH-*Leishmania* se reportó en España en 1985 (de la Loma, Alvar et al. 1985). Desde entonces se han reportado casos de coinfección en más

de 35 países, existiendo una evolución temporal conjunta de ambas enfermedades (Figura 12).



**Figura 12.** Evolución temporal conjunta del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la coinfección con *Leishmania sp.* incluyendo la primera descripción de un caso de coinfección en 1985. Imagen de elaboración propia.

La superposición geográfica de la leishmaniasis visceral humana con la infección por el VIH supone un problema de salud pública emergente con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Alvar, Aparicio et al. 2008, Martins-Melo, Lima Mda et al. 2014).

La infección por *Leishmania* junto a la infección por el VIH induce una activación inmune crónica, y por tanto un incremento en la carga viral y acelera la progresión al estadio de SIDA; mientras los desajustes provocados por el virus son favorables para la multiplicación incontrolada del parásito (Bentwich 2003).

El tratamiento de la coinfección continúa siendo el mayor reto teniendo en cuenta la baja eficacia terapéutica, la mayor frecuencia de reacciones adversas, las recaídas y la mayor mortalidad. En los pacientes coinfectados tratados para *Leishmania* se ha observado una toxicidad mayor, fallos en el tratamiento parasitológico (sobre el 30%) y en el tratamiento con antimoniales pentavalentes, con ratios de fatalidad superiores al 24% (Bern, Maguire et al. 2008, Diro, Lynen et al. 2014) Un estudio aleatorizado llevado a cabo recientemente en Etiopia, ha puesto de manifiesto la mejora en la respuesta si se administra el tratamiento de manera combinada (AmBisome® con miltefosina) (Diro, Lynen et al. 2014).

Mientras que en Europa el uso extendido del TARGA ha resultado en una pronunciada reducción de la incidencia de la coinfección VIH-LV, las recaídas en los sujetos coinfectados continúan siendo superiores al 60% después de un año y la profilaxis

secundaria tiene solo un efecto parcial (ter Horst, Collin et al. 2008) (Cota, de Sousa et al. 2014).

Incluso con el acceso a una quimioterapia completa (tanto frente al virus como frente a *Leishmania*) el pronóstico de la coinfección continúa siendo subóptimo. En contraste con otras muchas infecciones oportunistas, la recuperación de las células T CD4+ se retrasa de manera severa, incluso en los casos en los que se alcanza la supresión virológica (Badaro, Goncalves et al. 2015) (Lawn, Myer et al. 2006).

Debido a que la enfermedad afecta a los pacientes más pobres y las poblaciones más desatendidas dentro de las enfermedades olvidadas, es común un subregistro de los casos en la mayoría de las áreas endémicas. Además los pacientes coinfectados se consideran reservorios de la leishmaniasis visceral, por lo que representan un problema a resolver de cara a las estrategias actuales de eliminación (Stein, Green et al. 2011).

#### **1.8.1.1 Tratamiento y seguimiento de los pacientes VIH-LV tratados**

En los pacientes curados de leishmaniasis visceral coinfectados con el virus VIH se han descrito diferentes factores de riesgo para sufrir recaídas como son los niveles de T CD4+ por debajo de las 100 células/mm<sup>3</sup>, bajo incremento de los niveles de T CD4+ en respuesta al TAR, la falta de una profilaxis secundaria y una historia previa de recaída (Cota, de Sousa et al. 2011).

La profilaxis secundaria reduce significativamente las recaídas y debe ser iniciada después de finalizar el tratamiento de manera correcta (Alvar, Aparicio et al. 2008) (Lopez-Velez 2001, Who 2010). No se encuentra bien definido cuál es el mejor régimen para esta profilaxis (tratamiento, dosis, intervalo de tiempo entre dosis...) (Gradoni L 2017. ). Además, no hay recomendaciones seguras para el mantenimiento de la profilaxis secundaria.

Algunos expertos recomiendan mantenerla indefinidamente. Otros sugieren retirarla en pacientes seleccionados que tienen los niveles de T CD4+ por encima de las 200-350 células/mm<sup>3</sup> y que no han presentado ninguna recaída en los últimos 6 meses, que presenten una carga viral indetectable por más de 3 meses, y con PCR negativa para *Leishmania* en sangre. Si se retirase la profilaxis, hay recomendaciones de reiniciarla si el recuento de T CD4+ cae por debajo de las 200 células/ mm<sup>3</sup> (Who 2010) (Berenguer, Cosin et al. 2000, Casado, Lopez-Velez et al. 2001).

### 1.8.2 Enfermedades autoinmunes y leishmaniasis

Los linfocitos T en su proceso de maduración aprenden a no desarrollar respuesta frente a los componentes del propio organismo. Si este proceso falla se deriva en fenómenos de autoinmunidad. Las diferentes formas de patología autoinmunes son un problema de salud frecuente en buena parte de la población.

Las sucesivas generaciones de fármacos de acción inmunosupresora han ido desarrollando cada vez mecanismos de citotoxicidad más específica, con menos efectos colaterales para los pacientes (Mariscal, Carnero-Varo et al. 1999). Dentro de la diversidad de eventos clínicos que obligan a suprimir la reacción inmune los principales son el trasplante de órgano, la prevención de la enfermedad hemolítica por Rh incompatible con el neonato y las enfermedades autoinmunes (como la psoriasis o el lupus).

Los mecanismos de acción inmunosupresora de los fármacos existentes en la actualidad son los siguientes (Denton and Black 1999):

1. Inhibición de las citoquinas imprescindibles para la activación de la respuesta inmune mediante el bloqueo de la producción y transcripción génica.
2. Bloqueo de la acción de factores promotores de las citoquinas a nivel citoplasmático.
3. Interrupción de la señal de activación en la membrana linfocitaria por bloqueo de receptores y otras moléculas como la CD3.
4. Inhibición de la acción de citoquinas y factores de crecimiento de células T y B, así como de las células no inmunes, mediante el bloqueo de la replicación del ADN por depleción de purinas y pirimidinas.
5. Inhibición de la diferenciación y proliferación de los linfocitos T y B.

La introducción de estos fármacos inmunosupresores ha cambiado de manera drástica el curso de varias enfermedades autoinmunes crónicas. A pesar de su alta efectividad, su uso está claramente relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de infecciones causadas por microorganismos (Bongartz, Sutton et al. 2006, Winthrop 2006)

Cuando se evalúa a un paciente VIH+ que presenta fiebre y vive en una zona endémica, se conoce que es importante el diagnóstico temprano de leishmaniasis. Sin embargo, también se debe sospechar como diagnóstico diferencial en pacientes en condiciones de inmunosupresión no relacionadas con el VIH (Pittalis, Nicastrì et al. 2006). Los

individuos inmunodeprimidos farmacológicamente presentan unas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral que normalmente corresponden a las manifestaciones típicas de la enfermedad.

Los tratamientos que se utilizan de manera común para enfermedades autoinmunes como los esteroides, el metotrexato, o la ciclosporina se asocian con un aumento del riesgo de desarrollar LV y de la activación de una infección latente (Hadjipetrou, Anyfantakis et al. 2014). Dicho aumento también se ha reportado entre los pacientes que reciben fármacos inmunosupresores modernos, como el antagonista del TNF- $\alpha$  (Zanger, Kotter et al. 2012).

El tratamiento con glucocorticoides afectan a los linfocitos T citotóxicos bloqueando la expresión de citoquinas, lo que hace que se incremente la susceptibilidad a infecciones, sobre todo intracelulares como es la infección por *Leishmania* (Paliogianni, Ahuja et al. 1993). Además el uso prolongado de esteroides ha sido asociado con una disminución en la producción de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , citoquinas clave para resolver la leishmaniasis (Paliogianni, Ahuja et al. 1993).

Mientras que los trabajos iniciales en estos pacientes se basaban en el estudio del riesgo de desarrollo de tuberculosis, existen evidencias actuales sobre casos de leishmaniasis en estos pacientes tras varios meses con el tratamiento inmunosupresor (Zanger, Kotter et al. 2012, Guedes-Barbosa, Pereira da Costa et al. 2013). A pesar de que la LV es la clínica desarrollada en la mayoría de los pacientes, también se han reportado numerosos casos de LC y LMC (Garcia-Gonzalez, Guidelli et al. 2012, Gomes, Benevides et al. 2012).

También se han descrito casos de leishmaniasis en pacientes que reciben tratamiento crónico con esteroides debido a diversas patologías como el asma o la sarcoidosis (Garcia-Cordoba, Ortuno et al. 2005, Chianura and Cirasino 2006, Pittalis, Nicastrì et al. 2006) y que reciben otro tipo de medicamentos inmunosupresores, como los administrados para la enfermedad inflamatoria intestinal (Hagenah, Wundisch et al. 2007).

En la mayoría de los casos reportados de LV en pacientes en tratamiento inmunosupresor, el fármaco es retirado durante el tratamiento de la leishmaniasis, lo que permite al paciente desarrollar una buena respuesta frente al parásito (Venizelos, Tatiou et al. 2009, Toqeer, Rahman et al. 2012, Guedes-Barbosa, Pereira da Costa et al.

2013). Sin embargo no hay marcadores ni técnicas que permitan determinar el momento de reintroducción del tratamiento inmunosupresor o si es necesario realizar un cribado previo a la inmunosupresión de la inmunidad frente a *Leishmania* para la detección de infecciones asintomáticas en estos pacientes.

Las condiciones inmunosupresoras suponen un verdadero reto en las zonas en las que la leishmaniasis es endémica como se ilustra con el brote de la Comunidad de Madrid. De los 446 casos que se detectaron de julio de 2009 a diciembre de 2012, el 15,2% presentaban condiciones de inmunosupresión, la mayoría no relacionadas con el VIH (Arce, Estirado et al. 2013).

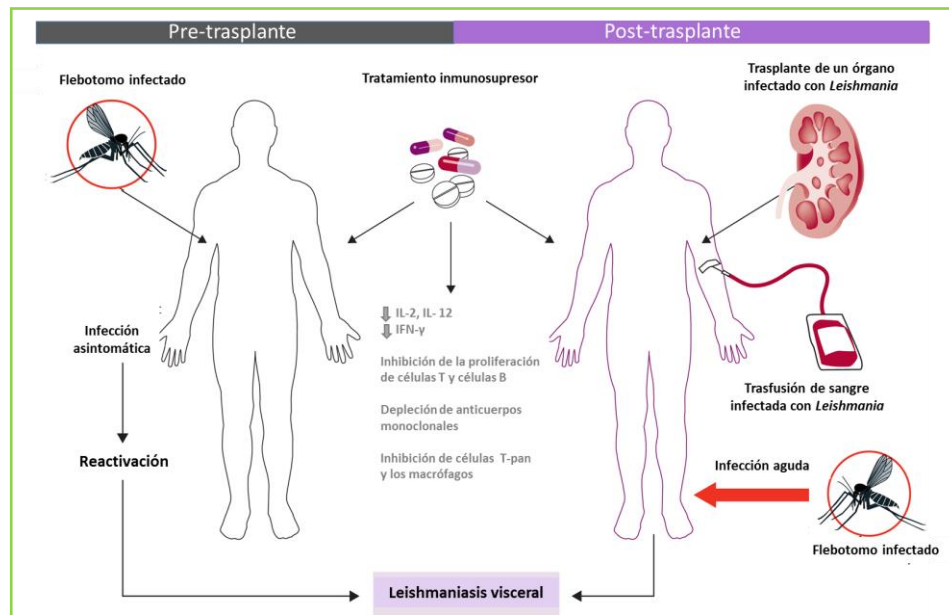
### **1.8.2.1 Tratamiento y seguimiento de pacientes inmunodeprimidos farmacológicamente**

Este tipo de pacientes tienen una respuesta más eficaz tras el tratamiento inicial respecto a la que presentan los pacientes VIH+, ya que generalmente se retira el tratamiento inmunosupresor durante el tratamiento de la leishmaniasis, y las tasas de recurrencia son menores que en los pacientes coinfectados con el VIH. A pesar de ello, también están predispuestos a recaídas. La profilaxis secundaria no está recomendada, sin embargo es necesario monitorizar a estos pacientes a lo largo del tiempo para prevenir posibles recaídas (Gradoni L 2017. ).

### **1.8.3 Trasplante de órganos y leishmaniasis**

El número de casos de LV entre los receptores de trasplante de órgano sólido (TOS) se han cuadruplicado desde los años 90 (Antinori, Cascio et al. 2008).

Se ha visto que los pacientes trasplantados pueden desarrollar leishmaniasis por tres vías (Figura 13), (i) reactivación de una infección latente, (ii) una infección derivada del donante (órgano o sangre) o (iii) infección primaria por picadura del vector. Estos pacientes pueden desarrollar leishmaniasis en cualquier momento después del trasplante, sin embargo las infecciones se presentan de manera común en el primer año post-trasplante (Antinori, Cascio et al. 2008).



**Figura 13.** Vías de adquisición de leishmaniasis visceral en pacientes trasplantados de órgano sólido: reactivación y nueva infección. Adaptado de (Antinori, Cascio et al. 2008).

Durante el estudio llevado a cabo en Fuenlabrada tras el brote de leishmaniasis se estudió una cohorte de pacientes TOS que residían en el área endémica. De los 68 receptores de TOS que se estudiaron 7 de ellos desarrollaron LV (Carrasco-Anton, Lopez-Medrano et al. 2017). En este estudio se confirmó que el grado de exposición a la infección, expresado como la distancia de la residencia de los pacientes al foco del brote, es un factor de riesgo clave (Carrasco-Anton, Lopez-Medrano et al. 2017), tal como se ha descrito en la población general (Ruiz et al., 2014).

El estudio de la inmunidad celular específica frente a *Leishmania* demostró la existencia de una población asintomática (Carrillo, Carrasco-Anton et al. 2015). Aunque el ratio de enfermedad clínica/subclínica en estos pacientes es mayor que en inmunocompetentes, la infección por el parásito no siempre conduce a una enfermedad activa (van Griensven, Carrillo et al. 2014). Todos estos datos resaltan la necesidad de evaluar la exposición previa al parásito en pacientes sometidos a inmunosupresión inducida.

#### 1.8.4 Malnutrición y leishmaniasis

Estudios observacionales han sugerido que tanto la malnutrición proteica como la deficiencia en micronutrientes pueden acelerar la progresión de la infección por *Leishmania* (Anstead, Chandrasekar et al. 2001, Collin, Davidson et al. 2004) y que a su vez la propia LV empeora la desnutrición (Luz, Succi et al. 2001, Van Weyenbergh, Santana et al. 2004).

Las poblaciones afectadas por LV frecuentemente sufren malnutrición. La experiencia clínica sugiere que los pacientes con LV se recuperan más rápidamente si reciben una suplementación al tratamiento con nutrientes (Akuffo, Costa et al. 2018). Tanto la OMS (Who 2010) como en las directrices nacionales de LV de la mayoría de los países endémicos recomiendan la administración de suplementos nutricionales antes del inicio de la terapia de la LV. Los alimentos terapéuticos listos para usar se encuentran disponibles en la mayoría de los hospitales de las regiones endémicas de LV como parte de los programas de control de la tuberculosis y el VIH. Dado que la LV continúa siendo una enfermedad desatendida, en la práctica, los pacientes con LV no reciben ninguna terapia nutricional, a menos que sean menores de cinco años de edad y estén incluidos en los programas de UNICEF, coinfectados con el VIH y/o tuberculosis (Akuffo, Costa et al. 2018).

### **1.9 Principales retos en el control de la leishmaniasis visceral**

Las infecciones asintomáticas por *Leishmania* suponen uno de los mayores retos frente al control de la leishmaniasis, ya que se desconoce el papel de estos individuos en la dinámica de transmisión de la enfermedad. Uno de los principales problemas que estos sujetos presentan es su identificación, ya que no existe un test de referencia validado. Por dicho motivo, dentro de las necesidades prioritarias establecidas por la OMS, se encuentra la búsqueda de marcadores de la infección asintomática y así como aclarar el papel que estos sujetos asintomáticos juegan en el ciclo de transmisión del parásito.

La leishmaniasis visceral presenta una gran importancia entre los pacientes inmunosuprimidos de zonas endémicas. A pesar de que se ha descrito previamente que hay pacientes VIH+ que son capaces de mantener la infección por *Leishmania* de manera asintomática, poco se conoce sobre si los pacientes que presentan inmunosupresiones inducidas mediante fármacos también son capaces de permanecer asintomáticos (Burza, Croft et al. 2018).

Otra de las prioridades establecidas por la OMS en el campo de la leishmaniasis es la búsqueda de marcadores relacionados con la cura en la leishmaniasis visceral, marcadores relacionados con el desarrollo de recaídas y marcadores del resultado del tratamiento que puedan ser utilizados como test de cura, válidos tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunosuprimidos.

El manejo de los pacientes inmunosuprimidos, ya sea por el tratamiento con fármacos inmunosupresores o por la infección por el VIH+, que sufren leishmaniasis visceral suponen otro de los grandes retos frente a la infección por el parásito. En estos pacientes, debido a la mayor predisposición que presentan a sufrir recaídas y el mayor riesgo de fallo del tratamiento, es importante encontrar marcadores que puedan ser usados para predecir de manera temprana recaídas.

La retirada del tratamiento inmunosupresor durante el tratamiento de la leishmaniasis, colabora en el desarrollo de una respuesta inmune frente al parásito. Sin embargo, se carece de un test de apoyo para decidir en qué momento se puede reintroducir el fármaco inmunosupresor de manera segura para el paciente.

En los pacientes VIH+, además, se administra profilaxis secundaria de forma crónica, encontrándose en debate si es necesaria en la mayoría de los pacientes en TARGA. Debido a que en la actualidad no hay consenso sobre el parámetro más adecuado para la retirada o la reintroducción de la profilaxis secundaria en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*, basándose generalmente estas decisiones en los niveles de linfocitos TCD4+, sería de gran utilidad encontrar marcadores que ayuden en la toma de estas decisiones.

Son todas estas cuestiones las que nos han llevado a plantearnos el desarrollo de esta tesis doctoral, con los objetivos que se describirán a continuación.





---

# OBJETIVOS

---





## 2. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es aplicar los ensayos de inmunidad celular para la identificación de biomarcadores relacionados con la infección asintomática y la cura en la infección por *Leishmania infantum*.

Con este fin, se evaluará la utilidad de la técnica de linfoproliferación celular, tras estimulación con el antígeno SLA, y la producción específica de citoquinas y granzima B, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos (infectados por el virus VIH o sometidos a inmunosupresión farmacológica) que han estado expuestos a la infección por *L. infantum* o han sufrido leishmaniasis visceral en Fuenlabrada, área endémica donde se ha descrito un brote reciente de leishmaniasis.

Este objetivo principal se divide en cinco objetivos específicos:

1. Caracterizar la población asintomática para *Leishmania* con técnicas diagnósticas serológicas, parasitológicas y celulares, y determinar la producción específica de citoquinas, para identificar biomarcadores relacionadas con dicha condición.
2. Estudiar la respuesta inmune específica en pacientes con leishmaniasis visceral antes y después del tratamiento farmacológico frente a *Leishmania*. Evaluar la expresión de biomarcadores asociados con la cura terapéutica o el pronóstico de recaída clínica.
3. Establecer pautas de manejo de pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*, fundamentalmente para decidir sobre la retirada/mantenimiento de la profilaxis secundaria.
4. Estudiar la utilidad de las técnicas celulares como herramienta de apoyo para la toma de decisiones sobre la reintroducción del tratamiento inmunosupresor en pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente.
5. Realizar el seguimiento en el tiempo de individuos asintomáticos y pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos que viven en zonas endémicas de leishmaniasis.

|

---

# MATERIALES Y MÉTODOS

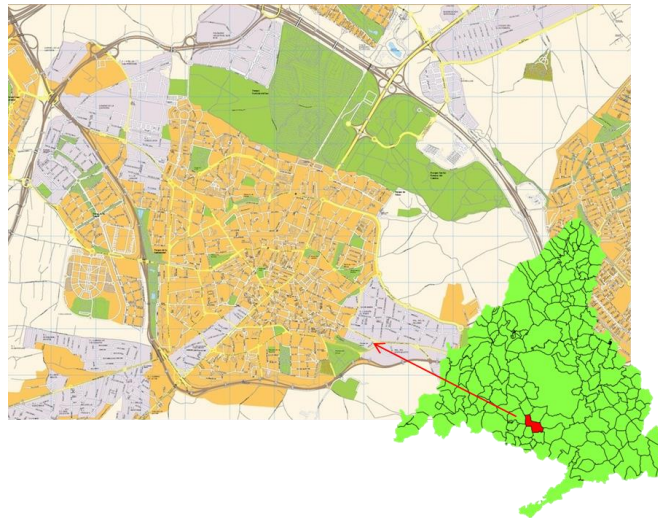
---



### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Población de estudio

Los individuos incluidos en este estudio provienen de Fuenlabrada, zona endémica de leishmaniasis situada en la zona sudoeste de la Comunidad de Madrid (Figura 14), en la que el brote reportado entre los años 2009 hasta 2015 ha dado paso a una zona de elevada transmisión de leishmaniasis, con un gran número de personas expuestas y una alta incidencia de casos de leishmaniasis visceral y cutánea.



**Figura 14.** Mapa de Fuenlabrada y localización del municipio dentro de la Comunidad de Madrid.

Las muestras empleadas en los diferentes estudios provenían del Hospital de Fuenlabrada y del Banco de Sangre del mismo hospital. Todos los individuos eran mayores de edad. Se incluyó un total de 196 individuos, con diferentes estados clínicos:

- ❖ Individuo control: individuo que no ha sufrido leishmaniasis, ni visceral ni cutánea, y que presenta las pruebas serológicas y moleculares frente a *Leishmania* negativas.
- ❖ Paciente activo (LVA): individuo con un episodio de leishmaniasis visceral activa que, en el momento de la toma de la muestra, presenta las manifestaciones clínicas de la enfermedad.
- ❖ Paciente curado (LVC): individuo que ha sufrido un episodio de la enfermedad activa y que tras la finalización del tratamiento se le considera clínicamente curado.

Dentro de cada uno de los estados clínicos los individuos estudiados presentaban diferentes estados inmunes incluyéndose inmunocompetentes, inmunosuprimidos farmacológicamente e infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

### 3.1.1 Características de los sujetos controles

Los individuos controles, de todos los grupos, fueron seleccionados al azar.

En este trabajo se han incluido un total de 60 individuos controles inmunocompetentes (IC), seleccionados entre un total de 600 individuos donantes del Banco de Sangre. Todos son sujetos sanos sin ningún tipo de patología asociada. La media de edad del grupo es de 42 años (con una desviación estándar de  $\pm 11,6$  años). El 71% de los individuos estudiados son hombres (43/60) y el 29% mujeres (17/60). Las características individuales de cada uno de los sujetos se encuentran en la tabla 1a de los anexos (página 149).

Los sujetos controles inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) que se han incluido fueron un total de 55, seleccionados de una cohorte de 562 sujetos que se encontraban en tratamiento inmunosupresor en el Hospital de Fuenlabrada durante los años del brote. Todos ellos se encuentran en tratamiento a causa de una enfermedad autoinmune pero sin otro tipo de patología o infección secundaria asociada. La media de edad del grupo es de 48 años (con una desviación estándar de  $\pm 12,9$  años). El 49% de los individuos estudiados son hombres (27/55) y el 51% mujeres (28/55). Las características individuales de cada uno de los sujetos se encuentran en la tabla 2a de los anexos (página 150).

Los sujetos controles infectados por el VIH que se incluyeron fueron un total de 40, pertenecientes a una cohorte de 101 individuos con VIH que se encontraban en seguimiento en el Hospital de Fuenlabrada. Todos ellos se encontraban en terapia antirretroviral, con correcta adherencia, para controlar la infección por el VIH pero sin otro tipo de patología. La media de edad del grupo es de 44 años (con una desviación estándar de  $\pm 9,9$  años). El 70% de los individuos estudiados son hombres (28/40) y el 30% mujeres (12/40). Las características individuales de cada uno de los sujetos se encuentran en la tabla 3a de los anexos (página 151).

### 3.1.2 Características de los pacientes que desarrollaron leishmaniasis visceral

En este trabajo se han incluido un grupo de pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa (n=13) y con leishmaniasis visceral curada (n=14). De los 13 pacientes con leishmaniasis visceral activa pudo obtenerse muestra del momento tras el tratamiento (pareado) en 11 casos. La media de edad del grupo es de 43 años (con una desviación estándar de  $\pm 10$  años). El 62% de los individuos estudiados son hombres (10/16) y el 38% mujeres (6/16). Las características individuales de cada uno de los sujetos se encuentran en la tabla 4a de los anexos (página 152).

Se incluyó un grupo de pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa (n=5) y con leishmaniasis visceral curada (n=14). De los 5 pacientes con leishmaniasis visceral activa pudo obtenerse muestra tras el tratamiento (pareado) para la leishmaniasis. La terapia inmunosupresora se retiró mientras se administró el tratamiento frente a la leishmaniasis, siempre que la enfermedad autoinmune lo permitiese, tal como aparece detallado en la tabla a5 de los anexos (pagina). La media de edad del grupo es de 60 años (con una desviación estándar de  $\pm 14$  años). El 57% de los individuos estudiados son hombres (8/14) y el 43% mujeres (6/14). Las características individuales de cada uno de los sujetos se encuentran en la tabla 5a de los anexos (página 153).

El otro grupo incluido en este estudio fue un grupo de pacientes infectados por el VIH con leishmaniasis visceral activa (n=5) y con leishmaniasis visceral curada (n=10). En el caso de estos pacientes, las muestras de momento activo (n=5) corresponden solo a dos pacientes: 1 paciente con leishmaniasis visceral activa y 1 paciente con varias recaídas clínicas (4 muestras del mismo paciente), de ambos se obtuvo también muestra tras la cura clínica (pareado). La media de edad del grupo es de 43 años (con una desviación estándar de  $\pm 10.38$  años). El 80% de los individuos estudiados son hombres (8/10) y el 20% mujeres (2/10). Las características individuales de cada uno de los sujetos se encuentran en la tabla 6a de los anexos (página 154).

Clínica Estatus	Leishmaniasis visceral activa	Leishmaniasis visceral curada (pareado)	Leishmaniasis visceral curada (no pareado)	Total leishmaniasis visceral curado
IC- <i>Leishmania</i>	13	11	3	14
ISF- <i>Leishmania</i>	5	5	9	14
VIH- <i>Leishmania</i>	1+ 1 recaída (4 muestras)	2	8	10

**Tabla 1.** Resumen del número de pacientes inmunocompetentes (IC) con leishmaniasis, inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) con leishmaniasis e infectados por el VIH (VIH) con leishmaniasis.

### 3.1.3 Consideraciones éticas y financiación

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Hospital de Fuenlabrada (APR 12-65 y APR14-64) y todos los individuos dieron su consentimiento por escrito para participar en este estudio. La toma de muestras de sangre se llevó a cabo entre los años 2013-2017, en el Hospital de Fuenlabrada y en el Banco de Sangre de dicho hospital, enviándose al Centro Nacional de Microbiología (CNM-ISCIH) para su procesamiento.

La toma y procesamiento de muestras provenientes del Hospital de Fuenlabrada y del Banco de Sangre, se realizó dentro del marco del proyecto financiado por el Instituto de Salud Carlos III, vía la Red de Investigación en Enfermedades Tropicales (RICET RD12/0018/ 0003 y RD12/0018/0008) y a través del proyecto ISCIH-AES “Impacto del brote de leishmaniasis en el sudeste de Madrid sobre la población inmunosuprimida” (PI13/00440). El estudio de cribado de la infección asintomática en las muestras provenientes del Banco de Sangre del Hospital de Fuenlabrada se llevó a cabo dentro del proyecto “Characterization of the concept ‘asymptomatic carrier’ in leishmaniasis: Implications for treatment” financiado por *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi)/ Fundación CSAI y que se desarrolló del año 2015 al 2017.

## 3.2 Métodos de laboratorio

### 3.2.1 Obtención de muestras

De cada paciente se obtuvo una o varias muestras de sangre completa. Las muestras fueron recogidas en tubos de Heparina-Litio en el Hospital de Fuenlabrada y enviadas a la unidad de Leishmaniasis y enfermedad de Chagas del Centro Nacional de Microbiología para su procesamiento.

De los 10 ml de sangre recibidos, 8 ml se destinaron para el ensayo de proliferación celular (apartado 3.2.3). 0,200 ml de sangre completa fueron utilizados para la tinción de subpoblaciones linfocitarias (apartado 3.2.4). Se aisló 1 ml de suero, por centrifugación desde los 10 ml de sangre, para la realización de las pruebas serológicas (apartado 3.2.5). Se utilizaron 0,200 ml de sangre completa para aislar el ADN (apartado 3.2.6.1) con el que se realizaron las pruebas moleculares (apartados 3.2.6.2 y 3.2.6.3).

### 3.2.2 Preparación del antígeno soluble de *Leishmania* (SLA)

Para la preparación del antígeno SLA se partió de un cultivo de promastigotes de *Leishmania infantum* (cepa JPC, MCAN/ES/98/LLM-722) crecidos en medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) suplementado con RPMI 1640 (Lonza, Suecia) (enriquecido con suero bobino fetal inactivado al 10% (Sigma, EE.UU.) y con 100 U/ml de penicilina estreptomicina (Lonza, Suecia).

Cuando el cultivo se encontraba en fase estacionaria, se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en tampón fosfato salino (PBS) 1X estéril (Gibco, EE.UU.). Se realizó un nuevo lavado, tras el cual el sedimento se resuspendió en tampón de lisis (50 mM Tris/5 mM EDTA/HCl, pH 7). A continuación los parásitos fueron sometidos a tres ciclos de congelación y descongelación seguidos de tres sonicaciones de pulsos de 20 segundos a 40 W.

El lisado de los parásitos se centrifugó a 27000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante que se obtuvo se recogió y se centrifugó a 100000 g durante 4 horas a 4°C. El sobrenadante se alicuotó y se congelaron las alícuotas a -80°C hasta su uso. Para conocer la concentración a la que se encontraba el antígeno, se realizó la cuantificación de proteínas usando el kit de Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

### 3.2.3 Ensayo de proliferación celular

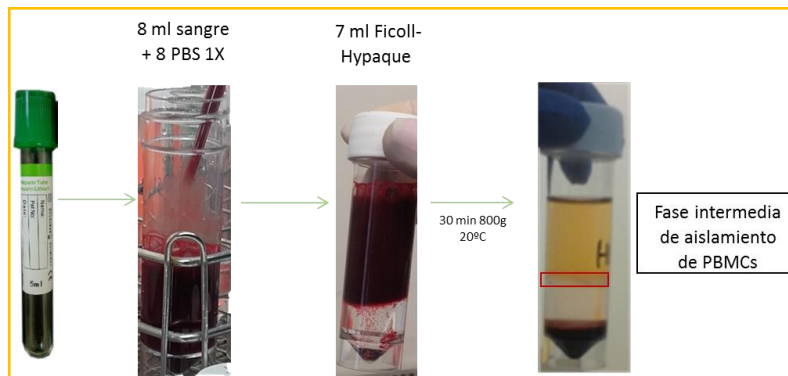
#### 3.2.3.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

A partir de las muestras de sangre completa recogidas en tubos de Heparina-Litio, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

El aislamiento de PBMCs se realizó mediante un gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (Lymphocytes Isolation Solution; Rafer, Reino Unido) en condiciones de esterilidad. Utilizando una pipeta de plástico desechable de 10 ml, se añadieron 8 ml de sangre sobre 8 ml de PBS 1X estéril. Con ayuda de una pipeta Pasteur muy lentamente se transfirió todo el volumen a un tubo que contenía 7 ml de Ficoll-Hypaque. Se centrifugaron las muestras a 800 g durante 30 minutos a 20°C, con una velocidad baja de aceleración y deceleración de la centrifuga. Tras la centrifugación se recoge la fase intermedia de las PBMCs con ayuda de la pipeta Pasteur. Posteriormente se lavaron las

células utilizando PBS 1X estéril mediante una centrifugación de 800 g durante 10 minutos a 10°C.

Con el fin de eliminar los eritrocitos, el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de ACK 1X (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) estéril a 4°C, dejándolo actuar durante 5 minutos. Para frenar la lisis, tras este tiempo se añadió PBS 1X estéril hasta un volumen 20 ml y se centrifugó a 800 g durante 10 minutos a 10°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de RPMI 1640 estéril.



**Figura 15.** Esquema de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) desde una muestra de sangre completa en Heparina-Litio.

Se utilizaron 50 µl de la suspensión de las PBMCs para llevar a cabo el conteo celular utilizando un contador de células automático, ajustando posteriormente la concentración a  $2 \times 10^6$  PBMCs/ml.

### 3.2.3.2 Estimulación de células mononucleares de sangre periférica

Para determinar la proliferación celular se utilizó el kit de Ensayo de Proliferación Celular BrdU (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido); se trata de un inmunoensayo colorimétrico basado en la medida de la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN.

Este ensayo se llevó a cabo en placas estériles de 96 pocillos (Life Science, EE.UU.). Las condiciones de estudio en las que se cultivaron las células fueron las siguientes: a) medio RPMI 1640 como control negativo de la proliferación; b) SLA a una concentración final de 10 µg/ml como estímulo específico frente a *Leishmania*; c) el mitógeno fitohemaglutinina tipo M (PHA) a una concentración final de 5 µg/ml como control positivo de la proliferación. Para cada condición las células se cultivaron por triplicado partiendo de una concentración inicial de  $2 \times 10^5$  PBMCs por pocillo y manteniéndose a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante seis días.

El quinto día de cultivo de las células se adicionaron 25µl por pocillo de una solución 10 µM de 5-bromo-2´desoxiuridina (BrdU) y se mantuvieron las placas otras 24 horas en incubación.

El sexto día de cultivo se centrifugaron las placas a 800 g durante 10 minutos a 10°C. Se recogieron 100 µl de sobrenadante de cada uno de los pocillos, almacenándose un volumen final de 300 µl por cada una de las condiciones estudiadas y manteniéndose a -20°C para el posterior estudio de determinación de las citoquinas secretadas (descrito en el apartado 3.2.3.3).

Para el revelado de las placas es necesario secarlas previamente. Posteriormente es necesario un proceso de fijación al fondo del pocillo, para ello se añadieron 200 µl por pocillo de la solución fijadora suministrada por el kit y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se retiró la solución fijadora y se añadió 200 µl de solución bloqueante por pocillo incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retiró la solución bloqueante y se añadieron 100 µl por pocillo del anticuerpo peroxidasa anti-BrdU. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron tres veces con el tampón de lavado suministrado por el kit. Para llevar a cabo la reacción colorimétrica se adicionaron 100 µl por pocillo de 3.3´5.5´-tetrametilbencidina (TMB), apareciendo un color azul en los pocillos en los que la reacción es positiva, incubándose las placas durante 10 minutos. Para frenar la reacción, se adicionaron 25 µl por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dando lugar a un color amarillo en los pocillos y las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450/620 nanómetros.

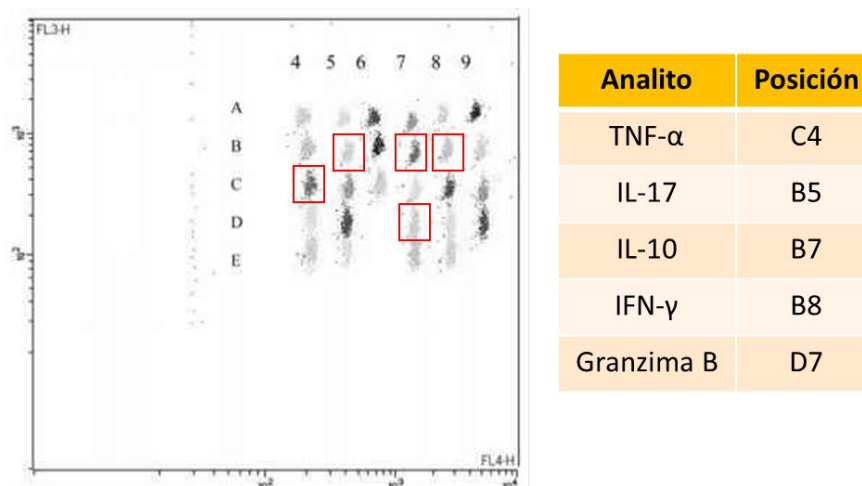
El índice de estimulación (IS) correspondiente a la proliferación celular, se calculó como el cociente entre la absorbancia media de los triplicados de las células incubadas con SLA entre la absorbancia media de los triplicados de las células cultivadas con RPMI 1640. El punto de corte se calculó tal como se describe en el apartado 3.2.8 y se encuentran resumidos en las tablas 7a-12a de los anexos.

Para conocer la viabilidad de las células se midió la proliferación frente a la PHA, calculándose como el cociente entre la absorbancia media de los triplicados de las células incubadas con PHA entre la absorbancia media de los triplicados de las células cultivadas con RPMI 1640.

### 3.2.3.3 Análisis de citoquinas y granzima B en sobrenadantes procedentes de cultivo celular

Se evaluó la secreción de distintas citoquinas y de granzima B en los sobrenadantes de cultivo celular tras la estimulación. Para ello se utilizó el kit BD Cytometric Bead Array Human Flex set (Beckton & Dickinson, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este sistema utiliza poblaciones de microesferas que se encuentran recubiertas de anticuerpos de captura específicos para cada uno de los analitos. Cada población queda dispuesta en una matriz con diferentes posiciones alfanuméricas cada una de las cuales corresponden a uno de los analitos (Figura 16), esto permite la determinación de diferentes analitos al mismo tiempo en la misma muestra.



**Figura 16.** Matriz de posiciones de las distintas microesferas y tabla con las posiciones correspondientes a las citoquinas y granzima B estudiadas.

En este trabajo, se midió la secreción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Granzima B, IL-10 e IL-17. A partir de la mezcla de los estándares liofilizados reconstituidos (suministrados por el kit), se realizaron 8 diluciones  $\frac{1}{2}$  seriadas dando lugar a la curva patrón del ensayo.

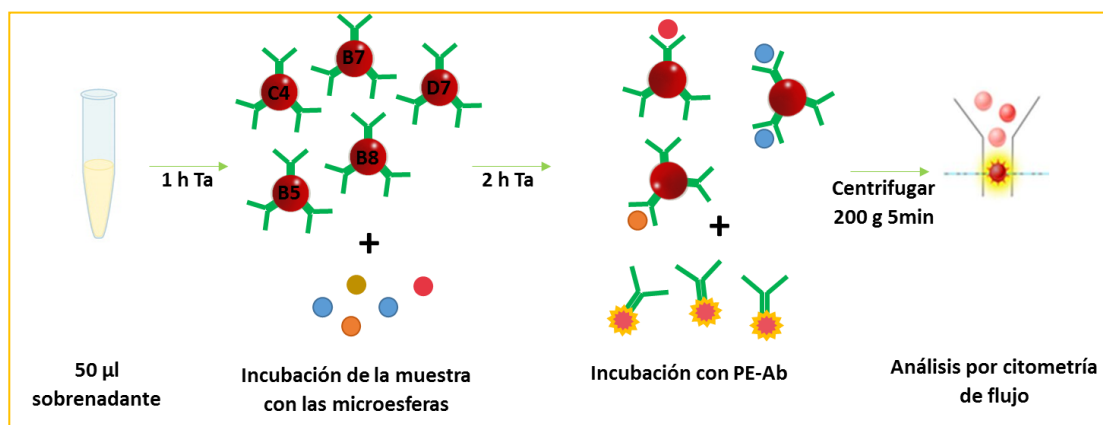
La concentración máxima de la curva estándar corresponde a 2.500 pg/ml para TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 y a 10.000 pg/ml para granzima B, llegando las diluciones seriadas hasta una concentración mínima de 10 pg/ml y de 40 pg/ml respectivamente tal como se muestra en la tabla 2.

Dilución	Estándar	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	-	Dilución
pg/ml	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	10	0	TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10
pg/ml	10000	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	0	Granzima B

**Tabla 2.** Diluciones de la curva estándar de los analitos estudiados expresada en pg/ml.

Todas las determinaciones se realizaron sobre 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla de las microesferas a cada una de las muestras, incluyendo a la curva patrón, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

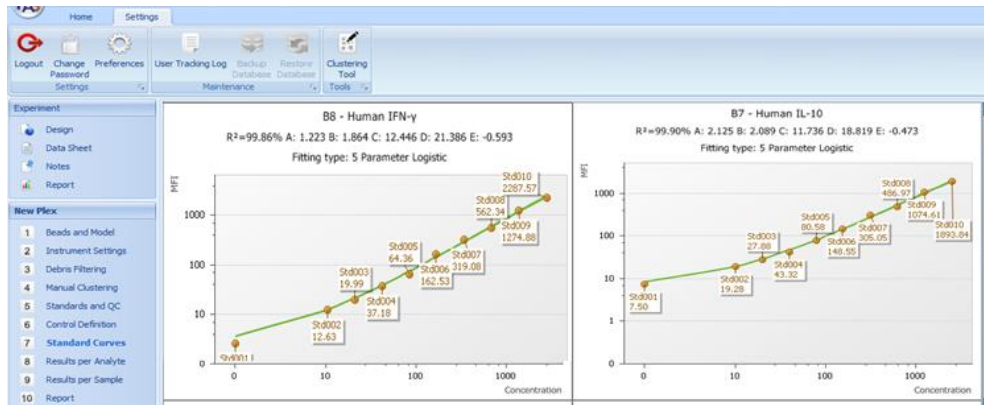
Posteriormente se añadió la mezcla del reactivo de detección que se encuentra conjugado con ficoeritrina (PE) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadió 1 ml de solución de lavado (suministrada en el kit) y se centrifugaron las muestras a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sustrato se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de solución de lavado. La adquisición de datos se realizó mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Beckton & Dickinson, EE.UU.).



**Figura 17.** Esquema de la determinación de analitos. Primero se incuba la muestra con la microesfera de captura. Tras una hora se vuelven a incuban con el anticuerpo de detección conjugado en ficoeritrina formándose un complejo tipo sándwich. Finalmente las muestras se analizan mediante citometría de flujo. Ta: temperatura ambiente

El análisis de los resultados se realizó mediante el software FCAP Array versión 3.0 (Beckton & Dickinson, EE.UU.). Los resultados se obtuvieron como valores de intensidad de fluorescencia media (MFI). Al tener la curva patrón de cada analito una concentración conocida permite asociar cada concentración a una MFI específica y crear una curva patrón de cada uno de los analitos. La extrapolación de los valores de MFI de cada una de las muestras problema sobre las curvas patrón permitió determinar la concentración de cada una de ellas.

Debido a que se quiere determinar la producción específica de cada citoquina frente al parásito, para cada individuo estudiado se restó la concentración de cada analito presente en los sobrenadantes sin estimular (control) de la concentración presente en los sobrenadantes estimulados con SLA. Los puntos de corte para la cada una de las citoquinas y para la granzima B se calcularon como se describe en el apartado 3.2.8 y se encuentran resumidos en las tablas 7a-12a de los anexos.



**Figura 18.** Ejemplo de la curva patrón de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las curvas estándar de las citoquinas IFN- $\gamma$  y IL-10.

### 3.2.4 Tinción de subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica

Para conocer el porcentaje relativo de las poblaciones celulares en la sangre completa de los individuos estudiados, se tiñeron las muestras utilizando los reactivos comerciales TriTest de BD (Beckton & Dickinson, EE.UU.). Esta tinción con anticuerpos monoclonales permite la determinación de la población de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos CD3+, células B, células NK y células NKT.

En la siguiente tabla se recogen la mezcla de anticuerpos conjugados comerciales utilizados para cada tipo celular.

Fluorocromo Tipo celular	FitC	PE	PerCP
Células T	CD4	CD8	CD3
Células B	CD3	CD19	CD45
Células NK y NK-T	CD3	CD56	CD45

**Tabla 3.** Panel de anticuerpos TriTest empleados para la identificación de las distintas poblaciones celulares estudiadas.

CD3 es un marcador de superficie presente en todos los linfocitos T. CD4 y CD8 son marcadores específicos de linfocitos T colaboradores (CD4+) y T citotóxicos (CD8+) respectivamente. CD45 es una glicoproteína expresada en la superficie de células B y natural killer (NK). CD19 es un marcador de desarrollo de los linfocitos B y CD56 es un marcador de las células NK y NK-T.

De cada una de las muestras de sangre se tomaron 200  $\mu$ l para realizar la tinción. Los 200  $\mu$ l se dividieron en cuatro alícuotas de 50  $\mu$ l de sangre cada una. Se realizaron tres tinciones diferentes: una tinción con anticuerpos específicos para células T, una tinción

con anticuerpos específicos para células B y una tinción con anticuerpos específicos para células NK y NK-T. La cuarta alícuota correspondía al control negativo.

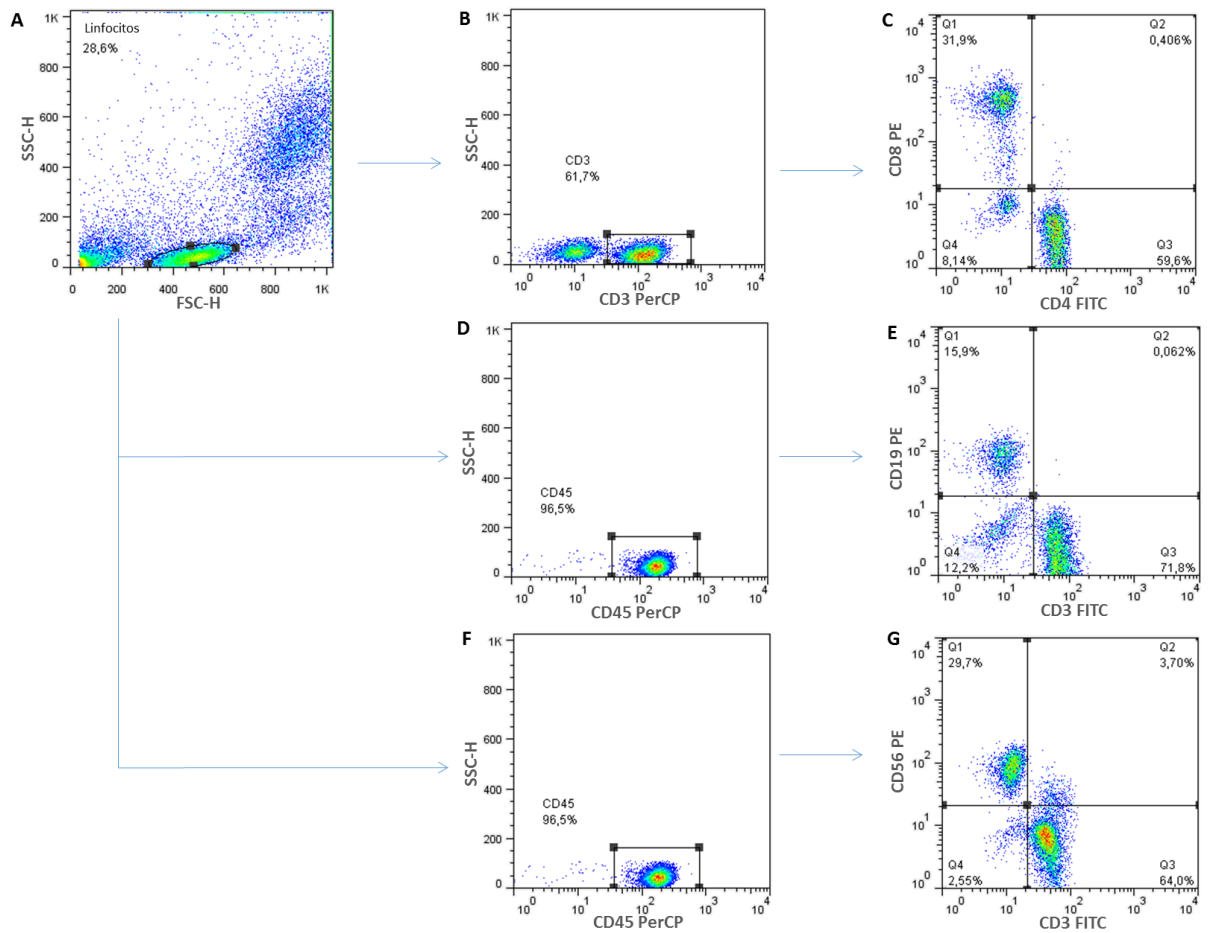
En primer lugar se añadió 1 ml de PBS-BSA (1% azida de sodio, 2% BSA) a cada uno de los tubos con los 50  $\mu$ l de sangre y se centrifugó durante 6 minutos a 1200 g. Se descartó el sobrenadante y sobre el sedimento obtenido se añadieron 10  $\mu$ l del anticuerpo, dejándolo en incubación durante 30 minutos en hielo y oscuridad. La muestra control se mantuvo en las mismas condiciones.

Transcurrida la media hora de incubación, se lavó la muestra utilizando 1 ml de PBS-BSA y se centrifugó 6 minutos a 1200 g. Después, para lisar los eritrocitos y así evitar que interfirieran en el análisis por citometría, se añadió 1 ml de FACS Lysing Solution BD (Beckton & Dickinson, EE.UU.) diluido 1/10 en agua destilada y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron como anteriormente y se lavaron con 1 ml de PBS-BSA, centrifugándolas nuevamente. El sedimento obtenido se fijó con 200  $\mu$ l de PBS- formaldehído 1% y las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su adquisición por citometría de flujo.

#### **3.2.4.1 Análisis por citometría de flujo para la determinación de las poblaciones celulares**

El análisis del marcaje de las muestras se realizó mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro FACS Calibur (Beckton & Dickinson, EE.UU.). La primera clasificación que se hizo fue atendiendo a dos parámetros: complejidad (SSC) y tamaño (FSC). Esta separación nos permite diferenciar y seleccionar una región correspondiente a los linfocitos, nuestra población de estudio (Figura 19A). En esta región se adquirieron un total de 10000 eventos por muestra, guardándose todos los datos para el análisis posterior. Una vez seleccionada la población, se midió la señal de fluorescencia emitida por las células.

Los porcentajes relativos de cada uno de los tipos celulares en la población de linfocitos se calcularon utilizando el programa informático FlowJo (versión 7.6.5). La primera clasificación se hizo atendiendo a la complejidad (SSC) y al tamaño (FSC) con el fin de seleccionar la región correspondiente a los linfocitos (Figura 19A).



**Figura 19.** Obtención de los porcentajes relativos de las distintas subpoblaciones linfocitarias mediante el programa FlowJo (versión 7.6.5) de los marcajes de la sangre completa de los individuos estudiados.

Determinación de las distintas poblaciones de linfocitos T.

Sobre la región de linfocitos se seleccionaron las células marcadas en CD3-PerCP, que son las correspondientes a los linfocitos T CD3+ (Figura 19B), obteniéndose el porcentaje relativo a esta población celular.

Mediante una representación en formato *dot plot*, se seleccionaron las marcadas en CD8-PE y CD4-FitC, que son las células correspondientes a los linfocitos T CD8+ (cuartil Q1 de la figura 19C) y los correspondientes a los linfocitos T CD4+ (cuartil Q3 de la figura 19C). Mediante este análisis se obtuvieron los porcentajes relativos de linfocitos T CD8+ y T CD4+.

Determinación de las células B.

Sobre la región de los linfocitos se seleccionan las células marcadas en CD45-PerCP (figura 19D). En esta región, se seleccionaron las marcadas en CD19-PE y CD3-FitC (cuartil Q1 de la figura 19E) y obteniéndose su porcentaje relativo de las células B.

### Determinación de la población NK y la subpoblación NK-T.

Primero se seleccionó la región de los linfocitos y sobre esta se seleccionan las células marcadas en CD45-PerCP (figura 19F). En esta región, se seleccionaron las marcadas en CD56-PE y CD3-FitC, que son las correspondientes a las células NK (cuartil Q1 de la figura 19G) y las células NK-T (cuartil Q2 de la figura 19G). Mediante este análisis se obtuvieron los porcentajes relativos a las células NK y a las células NK-T.

Con este procedimiento se logró conocer el recuento relativo de células para cada uno de las subpoblaciones, es decir, se obtuvo el porcentaje relativo de: linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T CD3+, células B, células NK y células NK-T. El número absoluto de linfocitos circulantes se obtuvo al multiplicar los porcentajes relativos obtenidos por citometría de flujo por el número de linfocitos totales que se obtuvieron al realizar el hemograma de la muestra de sangre (en este caso fue informado por el Hospital de Fuenlabrada).

El número absoluto representa el número de cada tipo celular por  $\text{mm}^3$  de sangre periférica y fue el que se utilizó para la representación gráfica de los resultados. Se establecieron los rangos de normalidad (máximo y mínimo) de las poblaciones celulares conforme a lo previamente establecido.

## **3.2.5 Pruebas serológicas**

### **3.2.5.1 Obtención de plasmas**

De todas las muestras de sangre en Heparina-Litio, se obtuvo el plasma. Para ello se centrifugaron las muestras a 800 g durante 10 minutos y se recolectó 1 ml plasma en condiciones de esterilidad. Las muestras se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior realización de los distintos ensayos serológicos (ELISA, IFI y rk39).

### **3.2.5.2 Inmunoensayo indirecto (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgG específicos frente al SLA**

La determinación de la presencia de anticuerpos IgG frente al antígeno SLA se llevó a cabo mediante la técnica ELISA. Los diferentes ELISAs se realizaron en placas de 96 pocillos de microtitulación Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

Las placas se sensibilizaron con el antígeno SLA en tampón carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  28 mM, pH 9) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las placas tres veces con una solución de lavado compuesta de PBS 1X con Tween 20 al 0,05%. Tras este proceso, las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con 200  $\mu\text{l}$  por pocillo de la solución de bloqueo compuesta por BSA al 1% en PBS 1X.

Se volvieron a lavar las placas tal como se describió anteriormente y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  por pocillo del plasma diluido 1/100 en la solución de lavado dejándolo en incubación durante 1 hora. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Se volvieron a lavar las placas tres veces utilizando la misma solución de lavado y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  por pocillo del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP-ratón anti Ig-G-humana) diluido 1/1000 en la solución de lavado. Tras 30 minutos de incubación a 37°C, se volvieron a lavar las placas tres veces.

A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de la solución comercial de sustrato o-fenilendiamina (OPD) (Sigma, EE.UU.) y se incubó en oscuridad y agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  por pocillo de la solución de frenado ( $\text{HCl}_2$ ). Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490/620 nanómetros. Los resultados se expresaron como densidad óptica.

Se calculó el punto de corte para el ELISA, tal como se describe en el apartado 3.2.8 de estos materiales y métodos. Basado en estos resultados, se estableció que la prueba es positiva si el valor de densidad óptica es mayor de 0.126 en inmunocompetentes, 0.124 en ISF y 0.136 en VIH+.

### **3.2.5.3 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Como técnica serológica *gold standard* de referencia, se llevó a cabo la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Primero, se fijaron promastigotes completos de *Leishmania* (cepa MHOM/FR/78/LEM 75) en fase estacionaria sobre portaobjetos negros sobre los que se va a realizar la técnica. Estos portaobjetos se mantuvieron a -20°C hasta la realización de la técnica. Se hicieron diluciones de los sueros en PBS 1X (diluciones 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/1280).

Antes de utilizarlos los portaobjetos, se fijaron los promastigotes con acetona (-20°C) durante 5 minutos. Después de dos lavados en agua destilada se dejaron secar. Se añadieron 10 µl de cada dilución de los sueros a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.

Tras la incubación se hicieron dos lavados en PBS 1X de 10 minutos de duración cada uno y un lavado con agua destilada, dejando que los portaobjetos se secaran. Se añadieron 10 µl del conjugado (anticuerpo secundario de cabra anti-IgG-humana) (BioMérieux, Francia) marcado en FitC diluido en 0.01% de Azul de Evans y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37°C en una cámara húmeda.

Se hicieron tres lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno, en oscuridad y agitación, tras lo cual se hizo un lavado con agua destilada y los portaobjetos se dejaron secar en oscuridad.

Los portaobjetos se montaron con glicerol-PBS pH 9.2 (9:1) y un cubreobjetos. Por último, los portaobjetos se leyeron en un microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo de 40X. Los resultados se expresaron como IFI negativo (cuando la titulación se encontraba en la dilución 1/40) o positivo (cuando la titulación se encontraba por encima de la dilución 1/80).

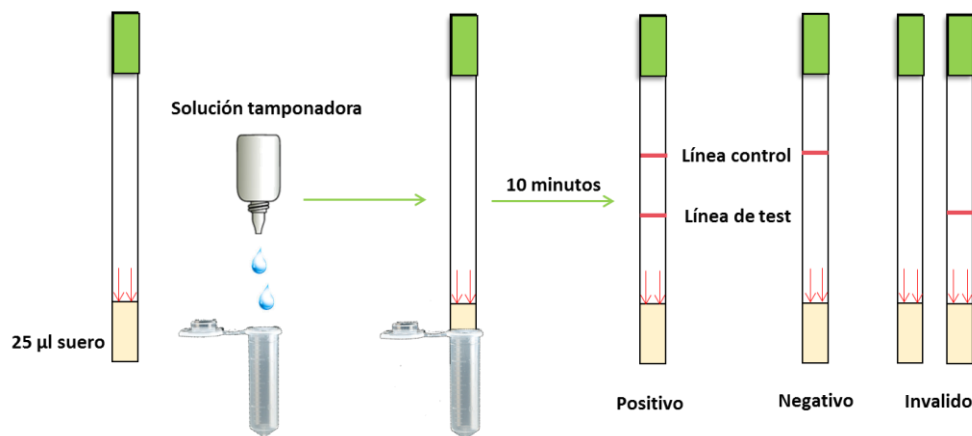
#### **3.2.5.4 Test rápido de detección de *Leishmania* (rk39-ICT)**

El test rápido de detección de *Leishmania* es un test inmunocromatográfico comercial (Kalazar Detect Rapid Test, Inbios International Inc., EE.UU.) para la detección cualitativa de anticuerpos frente a *Leishmania* en suero o sangre completa.

La tira diagnóstica tiene una banda control inespecífica y otra banda que reconoce de manera específica los anticuerpos frente a *Leishmania* presentes en la muestra.

Se añadieron 25 µl del suero sobre la tira y se introdujo en un tubo eppendorf que tenía aproximadamente 150 µl de la solución tampón incluida en el kit. Transcurridos 10 minutos se leyó el resultado.

El resultado es positivo si aparecen dos bandas, negativo si solo aparece la banda más alejada del punto de adición de la muestra (banda control) e inválido en el caso de no aparecer ninguna banda o si solo aparece la banda más cercana al punto de adición de la muestra (banda específica).



**Figura 20.** Metodología y posibles resultados del test inmunocromatográfico comercial rk39-ICT

### 3.2.6 Pruebas parasitológicas

#### 3.2.6.1 Extracción de ADN de las muestras de sangre completa

El ADN de las muestras fue aislado utilizando el método de fenol-cloroformo y precipitado con etanol (Cunha, Carrillo et al. 2013). Para la extracción de ADN se partió de 200 µl de sangre completa a los que se les añadió 400 µl de NET10 (10mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Tris HCl), 40 µl de SDS al 10% y 2 µl de proteinasa K (Sigma, EE.UU.). Las muestras se dejaron incubando en agitación toda la noche a 56°C.

Al día siguiente se añadió 500 µl de fenol-cloroformo por muestra y se centrifugó a 2600 g durante 6 minutos. La fase superior (fase acuosa) se recuperó sobre un nuevo tubo eppendorf que contenía 500 µl de cloroformo isoamílico y se volvió a centrifugar a 2600 g durante 6 minutos. En un tubo nuevo se recuperó la fase superior (sin tocar la interfase) sobre 700 µl de etanol absoluto + 30 µl de acetato 3M. Se mezcló por inversión 10 veces y se mantuvo durante 20 minutos a -80°C, tras lo cuales se volvió a centrifugar a 2600 g durante 6 minutos.

El pellet se resuspendió en 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 2600 g durante 6 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejaron secando los tubos al aire durante 24 horas. El ADN total se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril y se cuantificó su concentración en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Technology, EE.UU.).

### 3.2.6.2 PCR anidada

Partiendo del ADN extraído se realizó la PCR anidada (Ln-PCR). Esta PCR se basa en dos reacciones de PCR consecutivas utilizando dos pares de oligonucleótidos que amplifican el ADN de la subunidad ribosomal pequeña (SSUrRNA) de *Leishmania* (Cruz, Canavate et al. 2002).

En la primera reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos R221 (1 µl) y R332 (1 µl) más la mix de la reacción (30,6 µl agua destilada estéril + 5 µl de tampón 10x + 1 µl de dNTP+ 1,4 µl Tth ADN polimerasa) incluido en el kit (Biotools Biotechnological, EE.UU.). El programa de amplificación se realizó en el termociclador GenAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, EE.UU.) con una temperatura de anillamiento de 60°C y 30 ciclos de amplificación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Sentido
R221	GGTTCCTTCTGATTACG	Directo
R332	GGCCGGTAAAGGCCGAATAG	Reverso
R223	TCCCATCGCAACCTCGGTT	Directo
R334	AAAGCGGGCGCGGTGCTG	Reverso

**Tabla 4.** Secuencia de los distintos oligonucleótidos empleados en las dos reacciones de la Ln-PCR.

El producto amplificado de la primera reacción se diluyó 1/40 en agua destilada, utilizándose 10 µl de esta dilución para llevar a cabo la segunda reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos R223 (0,5 µl) y R334 (0,25 µl) más la mix de la reacción (10,55 µl agua destilada estéril + 2,5 µl de tampón 10x + 0,5 µl de dNTP+ 0,7 µl Tth ADN polimerasa) incluido en el kit. La amplificación se llevó a cabo a una temperatura de anillamiento de 65°C y 30 ciclos de amplificación.

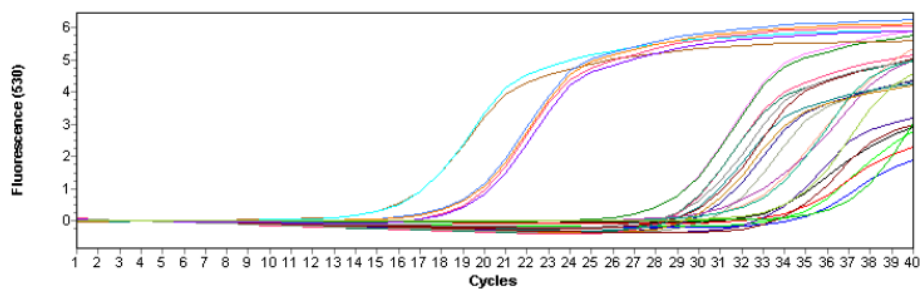
El producto de amplificación de la segunda PCR se visualizó en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE (Tris-acetato 0.04mM, EDTA 1µM, pH 8) teñido con GelRed (Biotium, EE.UU.) al 0.02% utilizando un transiluminador MiniBis-pro (DNR, Bio-imaging systems). Se observó una banda de amplificado de 358 pares de bases en el caso de las reacciones positivas.

### 3.2.6.3 PCR cuantitativa

Con el fin de conocer la carga parasitaria de las muestras de sangre que resultaron positivas en la Ln-PCR, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) empleando kit

comercial “ LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I” (Roche Diagnostics, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se realizaron con 4  $\mu$ l de ADN. Los oligonucleótidos empleados en esta qPCR fueron R223 (1,6  $\mu$ l) y R334 (0,80  $\mu$ l) que se añadieron a la mix de la reacción (10,40  $\mu$ l agua + 2  $\mu$ l SYBR Green + 1,2  $\mu$ l  $MgCl_2$ ).

La qPCR se realizó en el termociclador LightCycler 2.0 de alta velocidad (Roche Diagnostics, España) con un total de 40 ciclos correspondientes a la desnaturalización, el anillamiento y la extensión. Es en la extensión en punto en el que se mide la emisión de fluorescencia obteniéndose los valores del umbral de ciclo (CT, Cycle Threshold) (Figura) específicos para cada muestra y la temperatura de amplificación. Mediante el análisis de la temperatura de melting ( $T_m$ ), se estableció que la  $T_m$  específica a la que amplifica el ADN de *Leishmania* es 88°C.



**Figura 21.** Valores de los ciclos de amplificación específicos para cada muestra.

La concentración de parásitos/ $\mu$ l de cada muestra se obtuvo mediante extrapolación de su valor de ciclo CT en una curva estándar. Esta curva estándar se realizó a partir del ADN de *L. infantum* (cepa JPC, MCAN/ES/98/LLM-722) a una concentración correspondiente a  $10^6$  parásitos/ $\mu$ l, que se diluyó de manera seriada 1/10 en agua destilada hasta llegar a una concentración de  $10^{-2}$  parásitos/ $\mu$ l (Cunha, Carrillo et al. 2013).

Para analizar los resultados, a partir de la concentración de parásitos/ $\mu$ l obtenida, se calcularon los parásitos que había por  $\mu$ g de ADN en cada muestra, tal y como describe Cunha y colaboradores (Cunha, Carrillo et al. 2013). Para ello, se divide la concentración de parásitos obtenida tras la extrapolación en la curva, entre la concentración de ADN de la muestra, obteniéndose la cuantificación final de la carga parasitaria expresada en parásitos por  $\mu$ g de ADN.

### 3.2.7 Determinación de la carga viral en los pacientes con VIH

La determinación de la carga viral de los pacientes infectados por el VIH se realizó de manera rutinaria en el Hospital de Fuenlabrada. Para ello se utilizó la PCR comercial de Roche “Combas AmpliPrep Taqman HIV-1 v2.0” que presenta un límite de detección de < 20 copias del virus/ml.

Se trata de una prueba de diagnóstico *in vitro* basada en la amplificación de ácidos nucleicos totales para la detección cuantitativa de ADN y ARN (o ácido nucleico total, ANT) del VIH-1 en muestras de plasma. La cuantificación del ARN del VIH-1 es un reflejo de la replicación viral activa (Gonzalez-Alba, Rodriguez-Dominguez et al. 2011).

### 3.2.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados y representados mediante el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, EE.UU.). Se realizó un test de Shapiro-Wilk para conocer si los datos presentaban una distribución normal. Como no seguían dicha distribución, la comparación entre grupos se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

En todos los test estadísticos empleados las diferencias significativas se fijaron con  $p \leq 0,05$ . Para el análisis estadístico entre el momento activo y curado del mismo paciente (muestras pareadas) se realizó el test de Wilcoxon.

El punto de corte para la linfoproliferación positiva frente al antígeno SLA, para la evaluación de las citoquinas y para el ELISA, fue calculado empleando el área bajo la curva (AUC) y el intervalo de confianza (IC) 95% para cada uno de ellos (tablas anexos).



---

# RESULTADOS

---



## 4. Resultados

### 4.1 Estudio y caracterización de individuos con infección asintomática por *Leishmania* que no han sufrido un episodio previo de la enfermedad

Es ampliamente conocido que tras la infección por *Leishmania* una gran proporción de los individuos presentan una infección asintomática. Sin embargo, se carece de una técnica validada de referencia que permita la detección de estos individuos.

Por ello, uno de nuestros objetivos fue buscar marcadores relacionados con la infección asintomática, obteniendo los resultados incluidos en este apartado.

#### 4.1.1 Caracterización molecular, serológica y celular de individuos inmunocompetentes sin leishmaniasis clínica

Uno de nuestros objetivos fue caracterizar la población asintomática inmunocompetente de una zona endémica para leishmaniasis como es Fuenlabrada, evaluando la respuesta frente al parásito de individuos inmunocompetentes sanos.

En primer lugar se emplearon las técnicas moleculares (Ln-PCR) y serológicas (IFI, ELISA) tradicionales. Los resultados para estas pruebas fueron negativos en los 60 individuos estudiados (tabla 5A y 1B).

En segundo lugar, se evaluó la respuesta linfoproliferativa, medida como índice de estimulación, frente al antígeno del parásito. Esta técnica es 100% sensible y específica para la detección de la infección asintomática en individuos inmunocompetentes tal como demostró el cálculo de la curva ROC (tabla 7a anexos, página 155). Es por ello, que en este trabajo la respuesta linfoproliferativa se usó como test de referencia para la detección de individuos inmunocompetentes asintomáticos para *Leishmania*. Estos resultados indican que una respuesta linfoproliferativa positiva informa acerca de la exposición al parásito de estos sujetos.

Esta técnica celular nos permitió diferenciar claramente dos grupos de individuos, tal como se encuentra reflejado en la tabla 5 (A y B). Un grupo compuesto por 30 individuos que presentaron un índice de estimulación negativo (tabla 5A) y por tanto son controles negativos de la infección (C IC). Por otro lado, un grupo de 30 individuos

presentaron un índice de estimulación positivo (tabla 5B) y por tanto se clasificaron como asintomáticos para la infección (AS IC).

El estudio de la proliferación celular frente a la PHA nos informó que las células son viables en todos los individuos analizados (tabla 13a anexos, página 157).

Es importante aclarar que los datos aquí reflejados no indican la prevalencia real de la infección asintomática, pues se trata de un estudio llevado a cabo en un grupo de individuos seleccionados, no sobre el total de la población.

A	Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	IFI (título)		ELISA (D.O.)	
C IC 1	0,935	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,007	NEG
C IC 2	0,974	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG
C IC 3	1,048	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,008	NEG
C IC 4	0,741	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG
C IC 5	0,928	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG
C IC 6	0,905	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,005	NEG
C IC 7	0,908	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,027	NEG
C IC 8	1,050	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,078	NEG
C IC 9	0,845	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,020	NEG
C IC 10	0,947	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,017	NEG
C IC 11	0,946	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,014	NEG
C IC 12	1,100	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,022	NEG
C IC 13	1,420	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,045	NEG
C IC 14	1,171	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,017	NEG
C IC 15	1,116	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,031	NEG
C IC 16	1,026	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
C IC 17	0,460	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
C IC 18	1,381	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,049	NEG
C IC 19	0,914	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,031	NEG
C IC 20	0,758	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
C IC 21	1,100	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,009	NEG
C IC 22	1,584	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,007	NEG
C IC 23	1,143	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,034	NEG
C IC 24	0,761	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,023	NEG
C IC 25	1,716	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,035	NEG
C IC 26	1,673	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,008	NEG
C IC 27	1,708	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,018	NEG
C IC 28	1,464	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,033	NEG
C IC 29	1,339	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,022	NEG
C IC 30	1,154	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,004	NEG

B	Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	IFI (título)		ELISA (D.O.)	
AS IC 1	4,831	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG
AS IC 2	4,746	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,025	NEG
AS IC 3	7,169	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,033	NEG
AS IC 4	3,935	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,031	NEG
AS IC 5	7,051	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,008	NEG
AS IC 6	3,002	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,009	NEG
AS IC 7	2,820	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG
AS IC 8	5,603	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,014	NEG
AS IC 9	9,228	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,019	NEG
AS IC 10	6,167	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,007	NEG
AS IC 11	4,193	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,007	NEG
AS IC 12	10,275	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG
AS IC 13	4,713	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,065	NEG
AS IC 14	12,789	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,014	NEG
AS IC 15	3,685	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,005	NEG
AS IC 16	3,950	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,015	NEG
AS IC 17	4,059	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,019	NEG
AS IC 18	2,615	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,007	NEG
AS IC 19	2,574	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,032	NEG
AS IC 20	4,242	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,032	NEG
AS IC 21	3,370	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,068	NEG
AS IC 22	4,606	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
AS IC 23	3,862	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,030	NEG
AS IC 24	3,330	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,017	NEG
AS IC 25	3,083	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,000	NEG
AS IC 26	2,323	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,036	NEG
AS IC 27	2,397	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
AS IC 28	2,561	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG
AS IC 29	6,659	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,011	NEG
AS IC 30	2,590	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,014	NEG

**Tabla 5.** Resultado de la respuesta linfoproliferativa, Ln-PCR, IFI y ELISA (D.O: densidad óptica) de los sujetos inmunocompetentes (IC) controles negativos (C n=30) y asintomáticos (AS n=30).

#### **4.1.1.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los sujetos controles negativos y asintomáticos inmunocompetentes**

Dentro de la caracterización de la respuesta inmune frente al parásito, se evaluaron los niveles de producción de citoquinas relacionados con una respuesta protectora (tipo Th1) y la producción de granzima B que presentaban los controles negativos y los asintomáticos. También se evaluó la producción de IL-10 relacionada con la susceptibilidad a la infección (respuesta tipo Th2) y de IL-17 (respuesta tipo Th17).

En la figura 22A se muestra la respuesta linfoproliferativa (representada mediante el índice de estimulación) de los controles y los asintomáticos, encontrándose diferencias significativas entre ambos ( $p < 0.0001$ ).

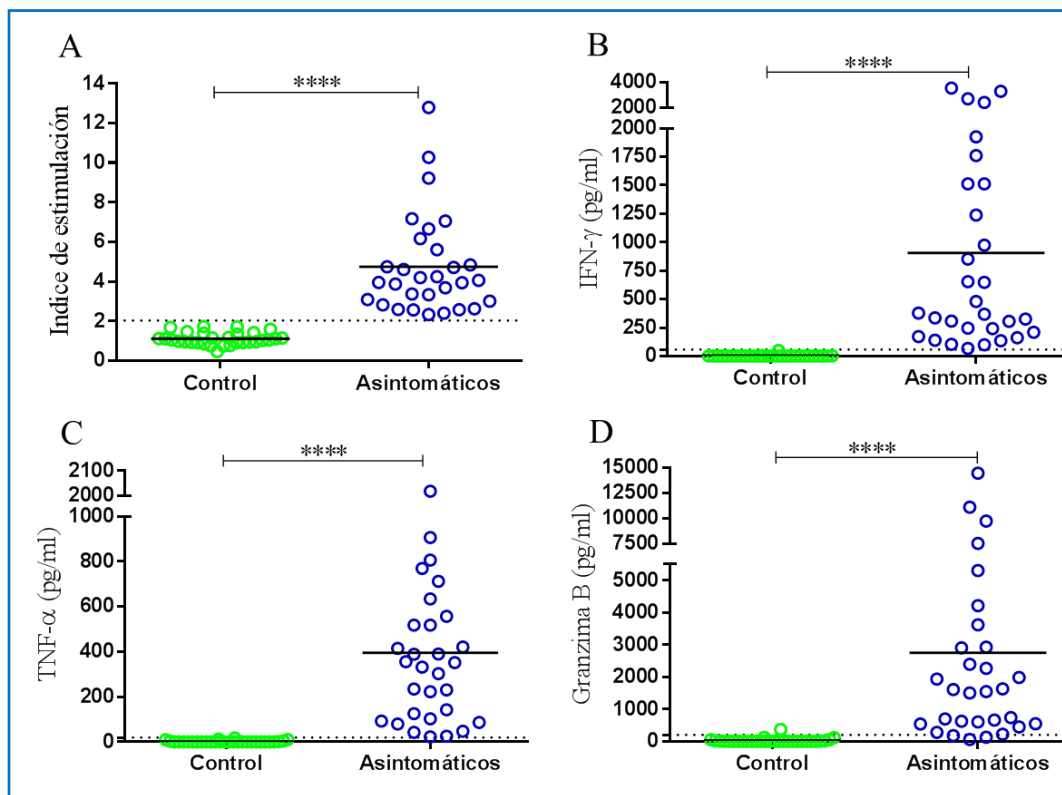
Debido a que la respuesta linfoproliferativa es nuestro test de referencia, la misma clasificación de control y asintomático obtenida se empleó para evaluar la sensibilidad y especificidad que presentaban la producción de citoquinas y granzima B para detectar individuos asintomáticos.

El análisis de la curva ROC mostró que también la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$  son 100% sensibles y específicas para la detección de sujetos inmunocompetentes asintomáticos (tabla 7a anexos, página 155). El punto de corte se situó en 57,71 pg/ml y 19,98 pg/ml respectivamente.

El estudio de la secreción específica de citoquinas tras estimulación con el antígeno SLA demostró que todos los sujetos clasificados como asintomáticos producen de manera específica IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Figura 22 B y C). Además 28 de los 30 individuos también producen granzima B (Figura 22D). Al comparar los resultados con los obtenidos en los sujetos controles, pudo verse que existen diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) para todos los analitos estudiados.

La producción media de IFN- $\gamma$  en los sujetos asintomáticos fue de 905,01 pg/ml, frente a una producción media de 2,08 pg/ml de los sujetos controles. En el caso de la producción media de TNF- $\alpha$  en los sujetos asintomáticos fue de 395,17 pg/ml, en contraste con la producción media de los controles que fue de 1,98 pg/ml. En el caso de la granzima B la producción media en los sujetos asintomáticos fue de 2749,31 pg/ml, frente a una producción media de 26,21 pg/ml que mostraron los sujetos controles.

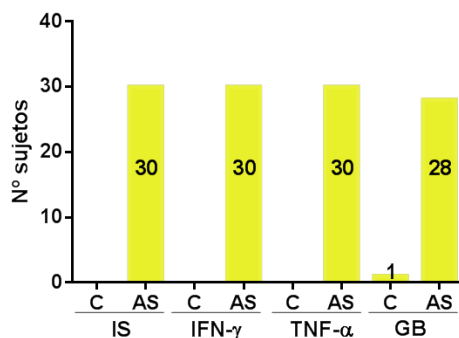
Ninguno de los sujetos estudiados, ni de los controles negativos ni de los asintomáticos, presentó secreción ni de IL-10 ni de IL-17 tras la estimulación con el SLA en los



sobrenadantes de cultivo.

**Figura 22.** (a) Índice de estimulación de las PBMCs estimuladas con SLA de los sujetos inmunocompetentes controles negativos y asintomáticos para *Leishmania*. Producción de citoquinas tras la estimulación con SLA de los sujetos inmunocompetentes controles y asintomáticos (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.

Por todo lo anterior, y tal como se resume en la figura 23, la población inmunocompetente asintomática se caracteriza, por una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación (IS) positivo, una producción específica en el sobrenadante de cultivo de IFN- $\gamma$  y una producción específica de TNF- $\alpha$ .



**Figura 23.** Número de casos positivos (amarillo) de los individuos inmunocompetentes control negativo (C) y asintomáticos (AS) en relación a la respuesta linfoproliferativa (IS) y la producción en los sobrenadantes de cultivo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B (GB) del total de los 30 individuos estudiados por grupo.

#### **4.1.2 Caracterización molecular, serológica y celular de individuos inmunosuprimidos farmacológicamente sin leishmaniasis clínica**

Con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune frente a *Leishmania* de la población inmunosuprimida farmacológicamente (ISF) residente en un área endémica e identificar una población asintomática, evaluamos una cohorte de individuos en tratamiento inmunosupresor que recibían tratamiento en el Hospital de Fuenlabrada.

Como en el caso de los individuos inmunocompetentes estudiados, se realizaron las técnicas moleculares (Ln-PCR) y serológicas (IFI y ELISA) para caracterizar a estos individuos. Estas pruebas resultaron negativas en los 56 individuos estudiados (Tabla 6A, 6B y 6C).

También se empleó la evaluación de la respuesta linfoproliferativa tras la estimulación de las PBMCs con el antígeno SLA como técnica celular. Para la identificación de sujetos asintomáticos inmunosuprimidos farmacológicamente el índice de estimulación resulta 100% específico, y 88,89% sensible (tabla 8a anexos, página 155). Para intentar detectar el 100% de los casos asintomáticos sería conveniente otra aproximación técnica que nos lo permitiera.

En el caso de los individuos inmunosuprimidos farmacológicamente existe un grupo de difícil clasificación usando únicamente esta técnica. Por un lado encontramos un grupo compuesto por 17 individuos con un índice de estimulación negativo que son controles negativos (C ISF, tabla 6A). Por otro lado, encontramos un grupo compuesto por 23 sujetos con un índice de estimulación positivo que se clasifican como asintomáticos (AS ISF, tabla 6B). También encontramos un grupo compuesto por 15 sujetos cuyo índice de estimulación se encuentra en el límite del punto de corte y se clasifican como dudosos (Duda ISF) (tabla 6C). La estimulación y proliferación inespecífica frente a la PHA demostró la viabilidad de las células en estos pacientes (tabla 13 a anexos, página 157).

A	Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	IFI (titulo)		ELISA (D.O.)	
C ISF 1	1,310	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,082	NEG
C ISF 2	1,271	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,013	NEG
C ISF 3	1,174	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,020	NEG
C ISF 4	1,132	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,033	NEG
C ISF 5	0,939	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,017	NEG
C ISF 6	1,357	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG
C ISF 7	1,544	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,004	NEG
C ISF 8	1,892	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,004	NEG
C ISF 9	1,512	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,055	NEG
C ISF 10	1,447	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG
C ISF 11	1,246	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,003	NEG
C ISF 12	1,461	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,001	NEG
C ISF 13	1,339	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,032	NEG
C ISF 14	1,545	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,005	NEG
C ISF 15	1,299	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG
C ISF 16	1,380	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,107	NEG
C ISF 17	0,832	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,030	NEG

B	Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	IFI (titulo)		ELISA (D.O.)	
AS ISF 1	2,679	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,033	NEG
AS ISF 2	6,948	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,001	NEG
AS ISF 3	3,646	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,012	NEG
AS ISF 4	3,086	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,008	NEG
AS ISF 5	2,322	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,034	NEG
AS ISF 6	4,584	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG
AS ISF 7	4,769	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
AS ISF 8	10,120	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,035	NEG
AS ISF 9	5,860	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG
AS ISF 10	3,233	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,035	NEG
AS ISF 11	2,626	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,008	NEG
AS ISF 12	3,197	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,137	NEG
AS ISF 13	5,063	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,139	NEG
AS ISF 14	3,904	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,027	NEG
AS ISF 15	2,738	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,001	NEG
AS ISF 16	3,217	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG
AS ISF 17	2,374	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,008	NEG
AS ISF 18	2,477	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,005	NEG
AS ISF 19	2,357	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,028	NEG
AS ISF 20	5,051	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,123	NEG
AS ISF 21	6,871	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,025	NEG
AS ISF 22	5,816	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
AS ISF 23	6,683	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,092	NEG

C	Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	IFI (titulo)		ELISA (D.O.)	
Duda ISF 1	2,117	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,001	NEG
Duda ISF 2	2,001	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,012	NEG
Duda ISF 3	1,964	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,023	NEG
Duda ISF 4	1,969	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,030	NEG
Duda ISF 5	2,220	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG
Duda ISF 6	1,915	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,004	NEG
Duda ISF 7	2,228	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG
Duda ISF 8	2,058	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,001	NEG
Duda ISF 9	2,225	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,029	NEG
Duda ISF 10	2,126	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG
Duda ISF 11	1,970	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG
Duda ISF 12	2,256	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,056	NEG
Duda ISF 13	1,841	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,001	NEG
Duda ISF 14	2,215	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG
Duda ISF 15	1,965	DUDA	NEG	< 1/40	NEG	0,003	NEG

**Tabla 6.** Resultado de la respuesta linfoproliferativa, Ln-PCR, IFI y ELISA (D.O.: densidad óptica) de los sujetos inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) controles negativos (C n=17), asintomáticos (AS n=23) y dudosos (Duda n=15).

#### 4.1.2.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los sujetos controles y asintomáticos inmunosuprimidos farmacológicamente

Dentro de la caracterización de los individuos inmunosuprimidos farmacológicamente, realizamos la medida de la producción de citoquinas y granzima B en los sobrenadantes de cultivo para caracterizar con más precisión el tipo de respuesta inmune celular de esta población y resolver el problema de los sujetos con un índice de linfoproliferación cercano al punto de corte que no podían clasificarse ni como controles ni como asintomáticos.

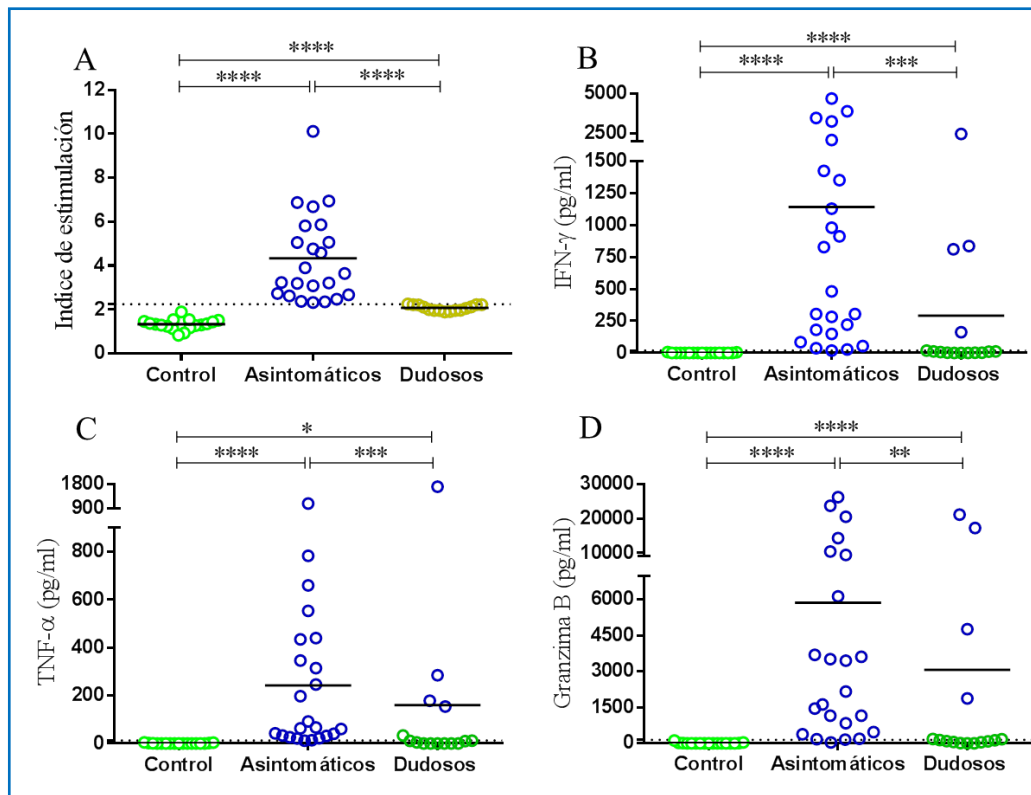
Mediante el análisis de la curva ROC, se determinó que la producción de IFN- $\gamma$  es 100% sensible y específica para la detección de esta población inmunosuprimida farmacológicamente asintomática para *Leishmania* (Tabla 8a anexos, página 155) definiéndose el punto de corte en 19,55 pg/ml. Esta sensibilidad y especificidad con respecto a la de la respuesta linfoproliferativa y a la producción de TNF- $\alpha$  y granzima B, hace que sea nuestra técnica de referencia para detectar sujetos inmunosuprimidos farmacológicamente con infección asintomática.

De los 15 individuos cuya respuesta linfoproliferativa se encontraba cercana al punto del corte (dudosos, figura 24A), 4 de ellos presentaban una producción específica de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B. En los sujetos clasificados como asintomáticos atendiendo a la respuesta linfoproliferativa también se encontró una producción específica de IFN- $\gamma$  y una producción específica de TNF- $\alpha$  y granzima B en 22 de los 23 (Figura 24 B-D). Los otros 11 sujetos que presentaron una respuesta linfoproliferativa cercana al punto de corte no presentaron producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ni de granzima B. Los sujetos controles tampoco presentaron producción específica de IFN- $\gamma$ , encontrándose producción de TNF- $\alpha$  en 4 de ellos y de granzima B en 5 (Figura 24 B-D). Al comparar los resultados con los obtenidos en los sujetos controles, pudo verse que existen diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre grupos.

En estos pacientes, el estudio de la producción específica de IFN- $\gamma$  en este grupo ha ayudado a aclarar los resultados de respuesta linfoproliferativa que se encuentran cercanos al punto de corte.

La producción media de IFN- $\gamma$  en los asintomáticos fue de 1103,45 pg/ml, frente a una producción media de 3,10 pg/ml que mostraron los controles. En el caso del TNF- $\alpha$ , la producción media en los asintomáticos fue de 282,85 pg/ml, en contraste con la

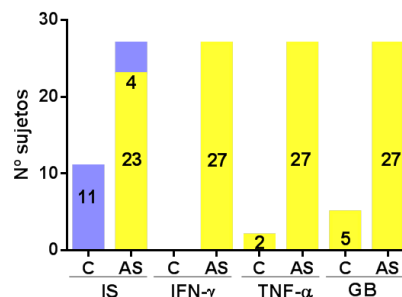
producción media de los controles que fue de 3,13 pg/ml. La producción media de granzima B en los sujetos asintomáticos fue de 6441,18 pg/ml, frente a la producción media de 41,79 pg/ml que mostraron los sujetos controles negativos.



**Figura 24.** (a) Índice de estimulación de las PBMCs estimuladas con SLA de los sujetos inmunosuprimidos farmacológicamente controles negativos, asintomáticos para *Leishmania* y dudosos. Producción de citoquinas tras la estimulación con SLA de los sujetos inmunocompetentes controles negativos, asintomáticos y dudosos (dentro de este grupo se representan en azul los que finalmente se clasificaron como asintomáticos y en verde como controles) (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.

Ninguno de los sujetos estudiados presentó secreción de IL-10 ni de IL-17 tras la estimulación con el SLA en los sobrenadantes de cultivo.

Los sujetos inmunosuprimidos farmacológicamente asintomáticos se caracterizan por presentar una producción específica de IFN- $\gamma$  el sobrenadante de cultivo celular, como se resume en la figura 25.



**Figura 25.** Número de sujetos con un resultado positivos (amarillo) o dudoso (azul) del total de individuos inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) controles negativos (C) y asintomáticos (AS) en relación al índice de estimulación (IS) y la producción en los sobrenadantes de cultivo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B (GB).

### 4.1.3 Caracterización molecular, serológica y celular de sujetos infectados por el VIH sin leishmaniasis clínica

Con el objetivo de identificar y caracterizar la población infectada por el VIH, se evaluó la respuesta inmune frente al parásito de sujetos VIH+ que recibían tratamiento antirretroviral en el Hospital de Fuenlabrada.

La determinación de la carga viral mostró que los sujetos VIH+ incluidos en este estudio presentaban una carga viral por debajo de las 1000 copias/ml de sangre o incluso indetectable (por debajo de las 20 copias/ml) por lo que se considera que en todos se encuentra controlada (datos proporcionados por el Hospital de Fuenlabrada).

Las pruebas moleculares (Ln-PCR) y serológicas (IFI y ELISA) para *Leishmania* resultaron negativas en todos los sujetos VIH+ estudiados (Tabla 7A y 7B), al igual que ocurría en los sujetos inmunocompetentes y los sujetos inmunosuprimidos farmacológicamente.

Mediante el análisis de la curva ROC, encontramos que la respuesta linfoproliferativa es 100% sensible y específica (Tabla 9a anexos, página 155) para la detección de sujetos VIH+ asintomáticos para la infección por *Leishmania*, y en este caso supone nuestro test de referencia para su detección. Una respuesta linfoproliferativa positiva indica un contacto previo con el parásito y refleja un control de la infección por parte del sujeto infectado.

Tras la estimulación de las PBMCs con el antígeno SLA, la respuesta linfoproliferativa permitió distinguir dos grupos claramente diferenciados. El primer grupo está compuesto por 23 sujetos con un índice de estimulación negativo que son controles negativos de infección (C VIH, tabla 7A). El otro grupo está compuesto por 17 sujetos con un índice de estimulación positivo que son asintomáticos (AS VIH, tabla 7B). La estimulación inespecífica de las PBMCs con la PHA demostró la funcionalidad de estas células, a pesar de la inmunosupresión causada por el virus que presentan estos pacientes (tabla 13a anexos, página 157).

A	Respeusta linfoproliferativa		Ln-PCR	IFI (titulo)		ELISA (D.O.)		rk39	B	Respeusta linfoproliferativa		Ln-PCR	IFI (titulo)		ELISA (D.O.)		rk39
C VIH 1	0,937	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,021	NEG	NEG	AS VIH 1	3,829	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,023	NEG	NEG
C VIH 2	1,016	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,030	NEG	NEG	AS VIH 2	3,079	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,017	NEG	NEG
C VIH 3	0,739	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,008	NEG	NEG	AS VIH 3	8,449	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,021	NEG	NEG
C VIH 4	0,915	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,017	NEG	NEG	AS VIH 4	4,119	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,005	NEG	NEG
C VIH 5	1,010	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG	NEG	AS VIH 5	6,060	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,073	NEG	NEG
C VIH 6	1,017	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,021	NEG	NEG	AS VIH 6	2,853	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,004	NEG	NEG
C VIH 7	0,907	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG	NEG	AS VIH 7	4,755	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,056	NEG	NEG
C VIH 8	0,828	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,031	NEG	NEG	AS VIH 8	4,348	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,010	NEG	NEG
C VIH 9	1,459	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG	NEG	AS VIH 9	3,052	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,046	NEG	NEG
C VIH 10	0,909	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,027	NEG	NEG	AS VIH 10	13,924	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG	NEG
C VIH 11	1,311	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,118	NEG	NEG	AS VIH 11	8,255	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,015	NEG	NEG
C VIH 12	0,741	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,085	NEG	NEG	AS VIH 12	3,346	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,014	NEG	NEG
C VIH 13	1,009	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG	NEG	AS VIH 13	12,829	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,048	NEG	NEG
C VIH 14	1,018	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG	NEG	AS VIH 14	8,006	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,017	NEG	NEG
C VIH 15	0,986	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,005	NEG	NEG	AS VIH 15	2,393	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,030	NEG	NEG
C VIH 16	0,886	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,031	NEG	NEG	AS VIH 16	5,112	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,020	NEG	NEG
C VIH 17	1,307	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,016	NEG	NEG	AS VIH 17	5,914	POS	NEG	< 1/40	NEG	0,057	NEG	NEG
C VIH 18	1,020	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,020	NEG	NEG									
C VIH 19	0,870	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG	NEG									
C VIH 20	1,943	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,003	NEG	NEG									
C VIH 21	0,720	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,012	NEG	NEG									
C VIH 22	0,834	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG	NEG									
C VIH 23	1,926	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,006	NEG	NEG									

Tabla 7. Resultado de respuesta linfoproliferativa, Ln-PCR, IFI y ELISA (D.O.: densidad óptica) de los sujetos infectados por el VIH controles negativos (C n=23) y asintomáticos (AS n=17) para *Leishmania*.

#### 4.1.3.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los sujetos controles negativos y asintomáticos infectados por el VIH

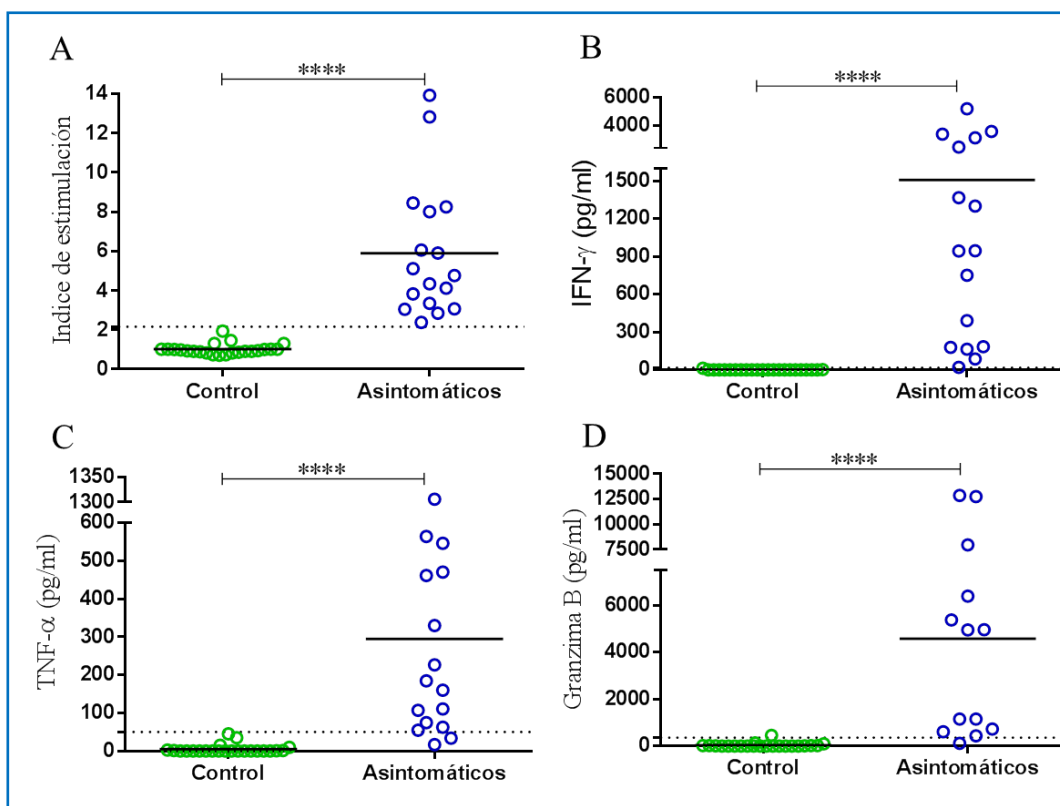
Para caracterizar el tipo de respuesta inmune celular que estos sujetos VIH+ habían desarrollado frente al parásito, se cuantificó la producción de citoquinas y granzima B en los sobrenadantes de cultivo estimulados con SLA.

La respuesta linfoproliferativa (representada mediante los valores del índice de estimulación) de los controles negativos y de los asintomáticos presentaba diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) entre ambos grupos (Figura 26A).

Al ser la respuesta linfoproliferativa nuestro test de referencia, utilizamos la clasificación obtenida mediante esta técnica para evaluar la sensibilidad y la especificidad que la producción de citoquinas y de granzima B tenían para la detección de la infección asintomática. El análisis de la curva ROC mostró que la producción de

IFN- $\gamma$  era 100% sensible y específica, encontrándose el punto de corte en 50,73 pg/ml (tabla 9a anexos, página 155).

Los sujetos controles negativos no presentaban secreción específica de IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , mientras que uno presentaba secreción de granzima B en los sobrenadantes de cultivo. Todos los sujetos asintomáticos presentaban una producción específica de IFN- $\gamma$  (Figura 26B). Además, 14 de los 17 sujetos asintomáticos presentan una producción específica de TNF- $\alpha$  y de granzima B (Figura 26 C y D). Al comparar los resultados con los obtenidos en los sujetos controles, pudo verse que existen diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ).



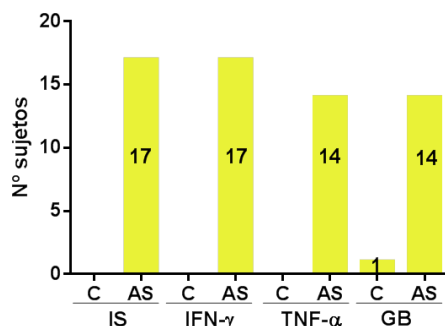
**Figura 26.** (a) Índice de estimulación de las PBMCs estimuladas con SLA de los sujetos infectados por el VIH controles negativos y asintomáticos para *Leishmania*. Producción de citoquinas tras la estimulación con SLA de los sujetos VIH+ controles y asintomáticos (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.

Ni los controles negativos ni los asintomáticos presentaban secreción de IL-10 ni de IL-17 tras la estimulación con el SLA en los sobrenadantes de cultivo.

La producción media de IFN- $\gamma$  en los sujetos asintomáticos fue de 1509,25 pg/ml, frente a una media de 0,79 pg/ml que mostraron los sujetos controles. En el caso de la producción media de TNF- $\alpha$  en los sujetos asintomáticos fue de 294,51 pg/ml, en contraste con la media de los controles que fue de 4,87 pg/ml. En el caso de la granzima B

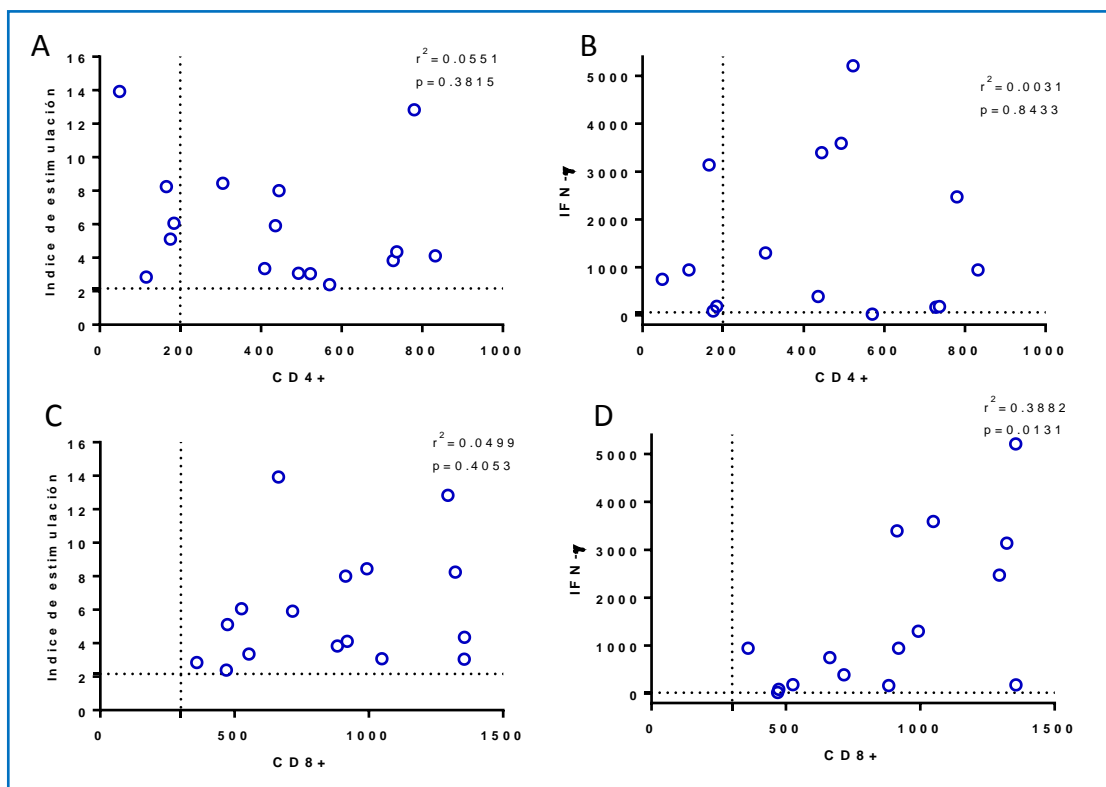
B la producción media en los sujetos asintomáticos fue de 4572,64 pg/ml, frente a la media de 37,44 pg/ml que mostraron los sujetos controles.

La población VIH+ asintomática para *Leishmania* se caracteriza, tal como se resume en la figura, por una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación positivo y una producción específica de IFN- $\gamma$  (Figura 27).



**Figura 27.** Número de sujetos que resultaron positivos (amarillo) de los individuos VIH+ control negativo (C) y asintomáticos (AS) en relación al índice de estimulación (IS) y la producción en los sobrenadantes de cultivo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B (GB).

En el caso de los sujetos infectados por el VIH asintomáticos para *Leishmania*, quisimos ver si el desarrollo de la respuesta específica frente al parásito estaba relacionada con el nivel de linfocitos TCD4+ o linfocitos TCD8+.



**Figura 28.** (a) Correlación del índice de estimulación con el nivel de linfocitos TCD4+, (b) de los niveles de IFN- $\gamma$  con el nivel de linfocitos TCD4+, (c) del índice de estimulación con el nivel de linfocitos TCD8+, (d) de los niveles de IFN- $\gamma$  con el nivel de linfocitos TCD8+ de los sujetos VIH+ asintomáticos para *Leishmania*.

En los sujetos VIH+ asintomáticos para *Leishmania* la respuesta inmune desarrollada frente al parásito es independiente de los niveles de linfocitos TCD4+ y de los niveles de linfocitos TCD8+. Esto se observa en la débil correlación que hay entre el índice de estimulación y los niveles de TCD4+ y de TCD8+ (Figura 28 A y C); y la débil correlación entre el IFN- $\gamma$  y los niveles de TCD4+ y de TCD8+ (Figura 28 B y D).

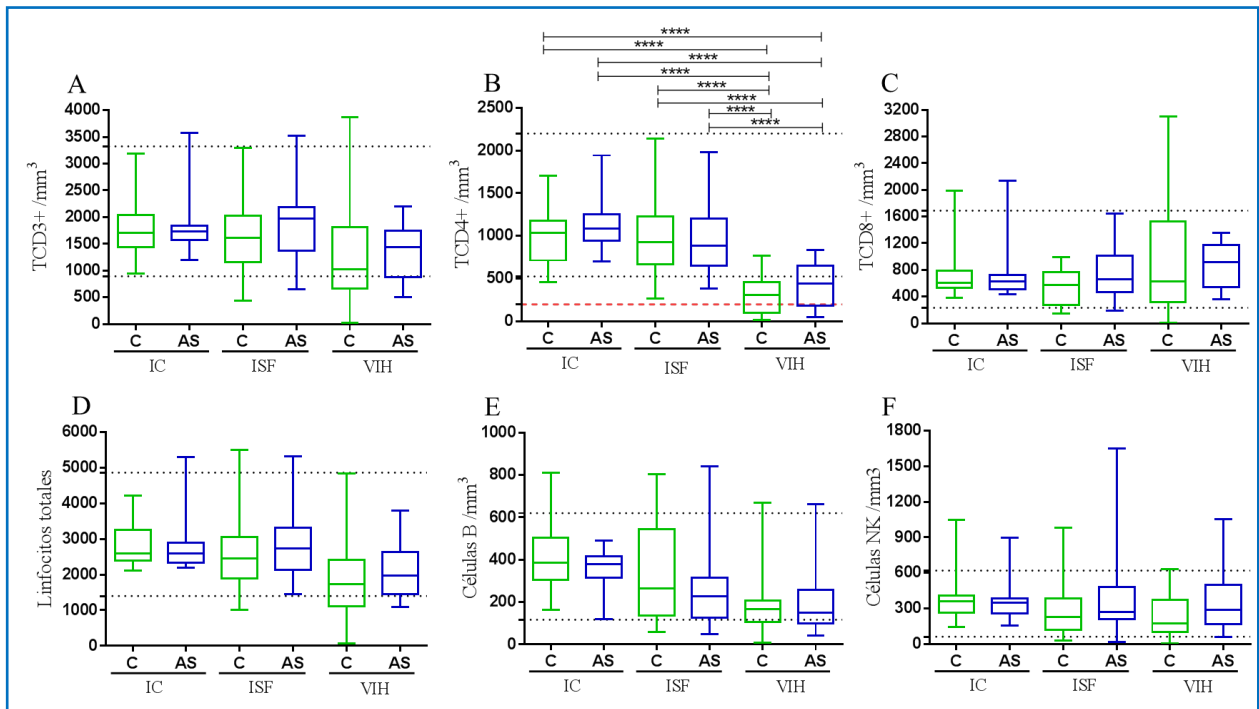
#### **4.1.4 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias circulantes de los sujetos controles negativos y asintomáticos inmunocompetentes, inmunosuprimidos farmacológicamente e infectados por el VIH**

Con el objetivo de establecer el efecto de la infección asintomática por *Leishmania* en los niveles de las distintas subpoblaciones celulares, caracterizamos las distintas subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de todos los sujetos controles negativos y asintomáticos estudiados.

Al analizar los valores absolutos de linfocitos TCD3+, linfocitos TCD4+, linfocitos TCD8+, células B, células NK y linfocitos totales; encontramos que en todos los grupos los valores se encuentran dentro de los límites de normalidad establecidos en la práctica clínica (Figura 29 A-F).

La excepción la representan los valores de linfocitos T CD4+ de los sujetos infectados por el VIH, que debido a su condición y a pesar de encontrarse en terapia antirretroviral con buena adherencia, no son capaces de restablecer el número de este tipo celular; encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros grupos estudiados ( $p < 0.0001$ ) y estando por debajo del límite de normalidad establecido en clínica (Figura 29B), 500 células/mm<sup>3</sup>, incluso por debajo de 200 células/mm<sup>3</sup> en algunos sujetos, lo que en estos pacientes es un factor predictor de su potencial evolución hacia SIDA.

Al comparar los datos de las poblaciones celulares de los controles negativos frente a los asintomáticos inmunocompetentes encontramos que no hay diferencias significativas. Lo mismo sucede al analizar los inmunosuprimidos farmacológicamente y los infectados por el VIH (Figura 29 A-F). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de células NK-T en ningún grupo (Figura 1a anexos, página 158).



**Figura 29.** (a) Niveles de linfocitos T CD3+, (b) T CD4+, (c) T CD8+, (d) linfocitos totales, (e) células B y (f) células NK de los sujetos controles negativos (C) y asintomáticos (AS) inmunocompetentes (IC), inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) e infectados por el VIH (VIH). Líneas punteadas negras: límites de normalidad de las poblaciones celulares establecidos en la práctica clínica. Línea roja: linfocitos TCD4+ 200 células/mm<sup>3</sup>.

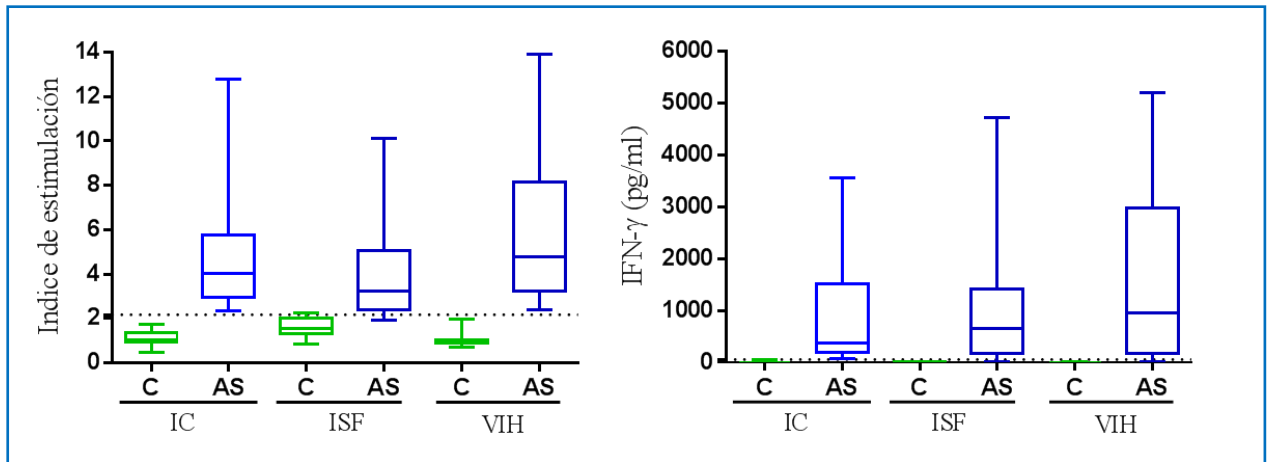
#### 4.1.5 Resumen de las características generales de los sujetos con infección asintomática por *Leishmania*

Nuestros resultados vistos de manera conjunta, muestran que los sujetos inmunocompetentes, inmunosuprimidos farmacológicamente e infectados por el VIH con infección asintomática por *Leishmania* se caracterizan por presentar una respuesta inmune celular específica frente al parásito.

Esta respuesta se caracteriza en los tres grupos estudiados, por una producción específica de IFN- $\gamma$  por parte de los sujetos asintomáticos. Además, todos los sujetos inmunocompetentes y los VIH+ presentan una respuesta linfoproliferativa positiva (Figura 30).

En el caso de los sujetos inmunocompetentes y VIH+ solo midiendo la respuesta linfoproliferativa, basándonos en la sensibilidad y especificidad que presenta, es suficiente para detectar el 100% de los individuos con infección asintomática. En el caso de los sujetos inmunosuprimidos farmacológicamente la menor sensibilidad (88,89%, tabla 8a anexos, página 155) hace que sea necesario medir la producción

específica de IFN- $\gamma$  (100% sensibilidad y especificidad) para la detección de todos los sujetos asintomáticos.



**Figura 30.** Respuesta linfoproliferativa y producción específica de IFN- $\gamma$  tras la estimulación con SLA de los sujetos control negativo (C) y asintomático (AS) para *Leishmania*: inmunocompetentes (IC); inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) e infectados por el VIH (VIH+)

### **4.2 Estudio, caracterización y monitorización de la cura de los pacientes con leishmaniasis clínica**

Uno de los objetivos principales identificados por la OMS frente a la *Leishmaniasis* es la búsqueda de un test válido para la caracterización de la cura y un test que sea predictor de recaídas, válido tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos.

Por todo ello, el otro objetivo de esta tesis doctoral fue la búsqueda de marcadores relacionados con la cura o con recaídas de leishmaniasis visceral obteniendo los resultados que se encuentran en este apartado.

#### **4.2.1 Caracterización molecular, serológica y celular de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa y curada**

Con el fin de monitorizar la respuesta de pacientes inmunocompetentes que sufrieron leishmaniasis visceral, se evaluó la respuesta serológica, molecular y celular de 13 pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa y de 14 pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral curada. De 11 de los pacientes estudiados con enfermedad activa se pudo obtener también una muestra tras la cura.

De los 13 pacientes que se estudiaron con leishmaniasis visceral activa, 11 presentaban Ln-PCR positiva en sangre completa, con carga parasitaria cuantificable mediante qPCR (Tabla 8, LVA). Tras la cura, todos los pacientes presentaron PCR negativa en sangre completa (Tabla 8, LVC).

En el momento de la enfermedad activa, 12 de los 13 pacientes inmunocompetentes presentaban una titulación positiva por IFI y un ELISA positivo (Tabla 8, LVA). Tras la cura clínica 6 pacientes permanecían con títulos positivos por IFI y con ELISA (Tabla 8, LVC).

Los datos obtenidos utilizando el test de diagnóstico rápido rk39-ICT muestran que 9 de los pacientes con enfermedad activa presentaban un resultado positivo (Tabla 8, LVA). En el caso de los pacientes curados, 7 de ellos presentaban un resultado positivo frente a este test (Tabla 8, LVC).

		Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	qPCR (p/ug DNA)	IFI (titulo)		ELISA (D.O.)		rK39-ICT
Pac IC 1	LVA	1,00	NEG	POS	703,000	1/320	POS	0,908	POS	POS
	LVC	2,06	POS	NEG	NEG	1/80	POS	2,052	POS	POS
Pac IC 2	LVA	0,76	NEG	POS	143,320	1/80	POS	0,558	POS	POS
	LVC	2,08	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,491	POS	POS
Pac IC 3	LVA	1,44	NEG	POS	27,680	1/80	POS	0,302	POS	POS
	LVC	4,02	POS	NEG	NEG	1/160	POS	0,438	POS	NEG
Pac IC 4	LVA	1,52	NEG	POS	301,750	1/160	POS	0,528	POS	POS
	LVC	2,28	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,102	NEG	NEG
Pac IC 5	LVA	1,03	NEG	NEG	NEG	1/80	POS	0,532	POS	POS
	LVC	3,93	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,234	POS	POS
Pac IC 6	LVA	1,97	NEG	POS	276,061	1/160	POS	1,418	POS	NEG
	LVC	1,60	NEG	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,280	POS	NEG
Pac IC 7	LVA	0,99	NEG	POS	1576,720	< 1/40	NEG	0,395	POS	POS
	LVC	3,05	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,094	NEG	POS
Pac IC 8	LVA	0,94	NEG	POS	3484,010	1/80	POS	0,174	POS	NEG
	LVC	5,74	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,028	NEG	NEG
		Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	qPCR (p/ug DNA)	IFI (titulo)		ELISA (D.O.)		rK39-ICT
Pac IC 9	LVA	1,61	NEG	POS	101,120	1/80	POS	0,288	POS	NEG
	LVC	2,93	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,023	NEG	NEG
Pac IC 10	LVA	1,24	NEG	POS	49,610	1/160	POS	0,403	POS	POS
	LVC	4,79	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,222	POS	POS
Pac IC 11	LVA	1,06	NEG	POS	751,938	1/160	POS	0,521	POS	POS
	LVC	6,24	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,761	POS	POS
Pac IC 12	LVA	0,80	NEG	POS	17,220	1/160	POS	1,076	POS	POS
	LVC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pac IC 13	LVA	1,34	NEG	NEG	NEG	< 1/160	POS	0,885	POS	NEG
	LVC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pac IC 14	LVA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	LVC	2,95	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,160	POS	POS
Pac IC 15	LVA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	LVC	11,24	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,078	NEG	NEG
Pac IC 16	LVA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	LVC	7,45	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,427	POS	NEG

**Tabla 8.** Resultado de la respuesta linfoproliferativa, Ln-PCR, qPCR (parásitos/μg DNA), IFI, ELISA (D.O.: densidad óptica) y rk39-ICT de los pacientes inmunocompetentes (IC) con leishmaniasis visceral activa (LVA) y leishmaniasis visceral curada (LVC).

A partir de los resultados obtenidos de la respuesta linfoproliferativa frente al antígeno SLA se realizó el análisis de la curva ROC, que demostró que en los pacientes inmunocompetentes este test es 94,44% sensible y 100% específica para establecer la cura (Tabla 10a anexos, página 156), siendo el punto de corte un valor de índice de estimulación de 2,015.

El estudio de la respuesta linfoproliferativa frente al SLA muestra diferencias entre los pacientes con leishmaniasis visceral activa y curada (Tabla 8, LVA). Todos los pacientes con enfermedad activa presentaban una respuesta linfoproliferativa negativa. Tras la cura de la enfermedad, 13 de los 14 pacientes curados estudiados (Tabla 8, LVC) presentaban una respuesta linfoproliferativa positiva. Todos los pacientes tanto con leishmaniasis visceral activa como con leishmaniasis visceral curada, presentaban una proliferación inespecífica frente al mitógeno (tabla 13a anexos, página 157).

### **4.2.1.1 Estudio de la producción de citoquinas y granzima B en pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa y curada**

Dentro de la caracterización de la respuesta inmune frente al parásito, se evaluaron los niveles de producción de citoquinas relacionados con una respuesta protectora (tipo Th1) y la producción de granzima B que presentaban los pacientes inmunocompetentes. También se evaluó la producción de IL-10 relacionada con la susceptibilidad a la infección (respuesta tipo Th2) y de IL-17 (respuesta tipo Th17).

El análisis de la curva ROC demostró que ninguna de las citoquinas estudiadas ni la granzima B resultan 100% sensibles para determinar la cura (tabla 10a anexos, página 156), tampoco mejoran la sensibilidad obtenida utilizando la respuesta linfoproliferativa.

Comparando los resultados obtenidos con respecto a la respuesta linfoproliferativa de los pacientes curados respecto a los activos, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) (Figura 31 A).

El estudio de la producción específica de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo estimulados con SLA mostró que 11 de los 14 pacientes curados presentan una producción específica de IFN- $\gamma$  (Figura 31B), mientras que ninguno de los activos presentaba producción de esta citoquina. De los pacientes curados 10 también presentaron una producción específica de TNF- $\alpha$  y 8 de granzima B (GB) (Figura 31C y D). Al comparar los resultados con los obtenidos en los pacientes con leishmaniasis visceral activa, puede verse que existen diferencias significativas (IFN- $\gamma$   $p < 0.0001$ ; TNF- $\alpha$   $p = 0.03$ ; GB  $p = 0.0013$ ).

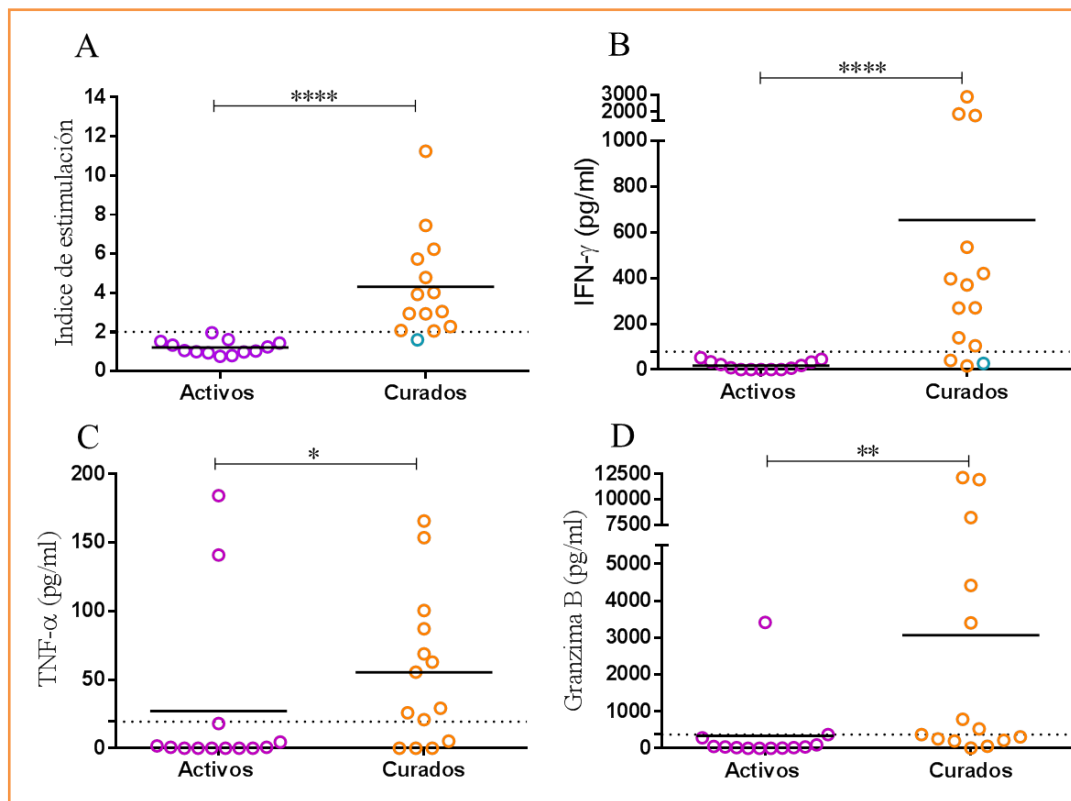
La producción media de IFN- $\gamma$  en los pacientes curados fue de 634,9 pg/ml, frente a una producción media de 17,02 pg/ml que mostraron los pacientes con enfermedad activa.

En el caso de la producción media de TNF- $\alpha$  en los pacientes curados fue de 54,59 pg/ml, en contraste con la producción media de los pacientes con enfermedad activa que fue de 27,03 pg/ml. En el caso de la granzima B la producción media en los pacientes curados fue de 2906 pg/ml, frente a la producción media de 335,6 pg/ml que mostraron los pacientes con enfermedad activa.

Ni en el momento activo de la enfermedad ni en el momento curado se detectó secreción de IL-10 ni de IL-17 en los pacientes estudiados.

Cabe destacar que el paciente que no presentaba ni respuesta linfoproliferativa ni producción de IFN- $\gamma$  (representado en azul en las gráficas de la figura 31 A y B) un mes después de la toma de la muestra sufrió una recaída de la enfermedad activa.

Si dentro del análisis de la curva ROC de la respuesta linfoproliferativa no se incluye el punto correspondiente al paciente que sufrió la recaída, la sensibilidad y la especificidad de la técnica es del 100%.



**Figura 31.** (a) Índice de estimulación de las PBMCs estimuladas con SLA de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa y curada. Producción de citocinas tras la estimulación con SLA de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa y curada (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.

Al analizar los datos pareados de los pacientes inmunocompetentes en los que pudo obtenerse muestra del momento activo y del momento curado (n=11) vimos que el

índice de estimulación frente al antígeno SLA aumenta significativamente tras la cura ( $p=0,002$ ), a excepción del caso del paciente que sufrió la recaída de la enfermedad. Además, de manera generalizada, hay un aumento significativo de la producción de IFN- $\gamma$  ( $p=0,004$ ) (figura 2a anexos, página 159).

En estos pacientes inmunocompetentes, la cura de la enfermedad se caracteriza por el desarrollo de una respuesta linfoproliferativa positiva acompañada, en la mayoría de los casos, de una producción específica de IFN- $\gamma$  tal como se resume en la figura 32.



**Figura 32.** Número de casos negativos (rosa) y positivos (amarillo) de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa (LVA) y con leishmaniasis visceral curada (LVC) en relación al índice de estimulación (IS) y la producción en los sobrenadantes de cultivo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B (GB).

#### 4.2.2 Caracterización molecular, serológica y celular de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa y curada

Dentro del objetivo de evaluar la respuesta inmune en pacientes sometidos a tratamiento inmunosupresor con leishmaniasis visceral activa y curada, se analizaron muestras de 5 pacientes con enfermedad activa y 14 con enfermedad curada.

En general en la práctica clínica, a los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente que desarrollan leishmaniasis visceral se les retira el tratamiento inmunosupresor durante el tratamiento de la leishmaniasis y se les reintroduce una vez curados de leishmaniasis. Esto se realizó en la mayoría de los pacientes incluidos en esta tesis; el tipo de enfermedad autoinmune que presentaban el paciente 3 y el 13 no permitió que en estos pacientes se retirase el tratamiento inmunosupresor de manera segura y por tanto se mantuvo durante el tratamiento de la leishmaniasis (tabla 5a anexos, página 153).

En el momento de la enfermedad activa, 3 de los 5 pacientes presentaban Ln-PCR positiva, con carga parasitaria detectable mediante qPCR (tabla 9, LVA). Tras la cura clínica de la enfermedad todos los pacientes presentaban PCR negativa (tabla 9, LVC).

Las pruebas serológicas (IFI, ELISA y rk39-ICT) fueron positivas en los 5 pacientes con leishmaniasis visceral activa (Tabla 9, LVA). En el momento de la cura, 3 de los 5 pacientes que se analizaron en el momento activo, mantenían las pruebas serológicas positivas. Del resto de pacientes curados estudiados, 6 pacientes presentaban las pruebas serológicas positivas mientras que 3 presentan alguna de las pruebas negativas (tabla 9, LVC).

		Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	qPCR (p/ug DNA)	IFI (título)		ELISA (D.O.)		rk39-ICT
Pac 1 ISF	LVA	0,863	NEG	POS	436,130	1/160	POS	3,375	POS	POS
	LVC	7,118	POS	NEG	NEG	1/320	POS	1,926	POS	POS
Pac 2 ISF	LVA	0,768	NEG	POS	7085,000	1/1280	POS	1,788	POS	POS
	LVC	5,706	POS	NEG	NEG	1/320	POS	2,954	POS	POS
Pac 3 ISF	LVA	2,525	NEG	POS	190,000	1/160	POS	0,143	POS	POS
	LVC	3,229	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,034	NEG	NEG
Pac 4 ISF	LVA	1,113	NEG	NEG	NEG	1/160	POS	0,432	POS	POS
	LVC	6,028	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,058	NEG	NEG
Pac 5 ISF	LVA	1,021	NEG	NEG	NEG	1/160	POS	0,665	POS	POS
	LVC	3,641	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,479	POS	POS
Pac 6 ISF	LVC	2,823	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,247	POS	POS
Pac 7 ISF	LVC	14,995	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,722	POS	POS
Pac 8 ISF	LVC	3,610	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,091	NEG	POS
Pac 9 ISF	LVC	5,374	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,002	NEG	NEG
Pac 10 ISF	LVC	3,790	POS	NEG	NEG	1/160	POS	1,206	POS	POS
Pac 11 ISF	LVC	2,726	POS	NEG	NEG	1/80	POS	1,413	POS	POS
Pac 12 ISF	LVC	7,231	POS	NEG	NEG	1/320	POS	0,410	POS	POS
Pac 13 ISF	LVC	5,247	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,642	POS	POS
Pac 14 ISF	LVC	9,987	POS	NEG	NEG	1/160	POS	0,761	POS	POS

**Tabla 9.** Resultado de la respuesta linfoproliferativa, Ln-PCR, qPCR (parásitos/μg DNA), IFI, ELISA (D.O.: densidad óptica) y rk39-ICT de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) con leishmaniasis visceral activa (LVA) y leishmaniasis visceral curada (LVC).

El cálculo de la curva ROC demostró que la respuesta linfoproliferativa frente al antígeno SLA, resulta 100% sensible y específica para establecer la cura en pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, encontrándose el punto de corte de la técnica en un índice de estimulación de 2,626 (tabla 11a anexos, página 156). Esto hace que en esta tesis utilicemos este ensayo como test de referencia para establecer la cura en este grupo de pacientes.

Todos los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa (Tabla 9, LVA) presentaban una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación negativo, al igual que ocurría en los pacientes inmunocompetentes. Tras la cura, los pacientes presentaban una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación positivo (Tabla 9, LVC), que en el caso de los pacientes aquí evaluados es independiente del tratamiento inmunosupresor que se le administre, del momento de su reintroducción y del tipo de enfermedad autoinmune que padezca (Tabla 5a anexos, página 153).

La determinación de la proliferación frente a la PHA, demostró que todos los pacientes son capaces de proliferar de manera inespecífica y por tanto que las células son viables (tabla 13a anexos, página 157) sin diferencias en la respuesta inespecífica entre los pacientes activos y los curados.

### **4.2.2.1 Estudio de la secreción de citoquinas y granzima B en los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa y curada**

Con el objetivo de determinar el perfil de la respuesta inmune celular que presentaban los pacientes se midió la producción de citoquinas relacionadas con la respuesta Th1, Th2 y Th17 además de la granzima B en los sobrenadantes de cultivo de las PBMCs estimuladas.

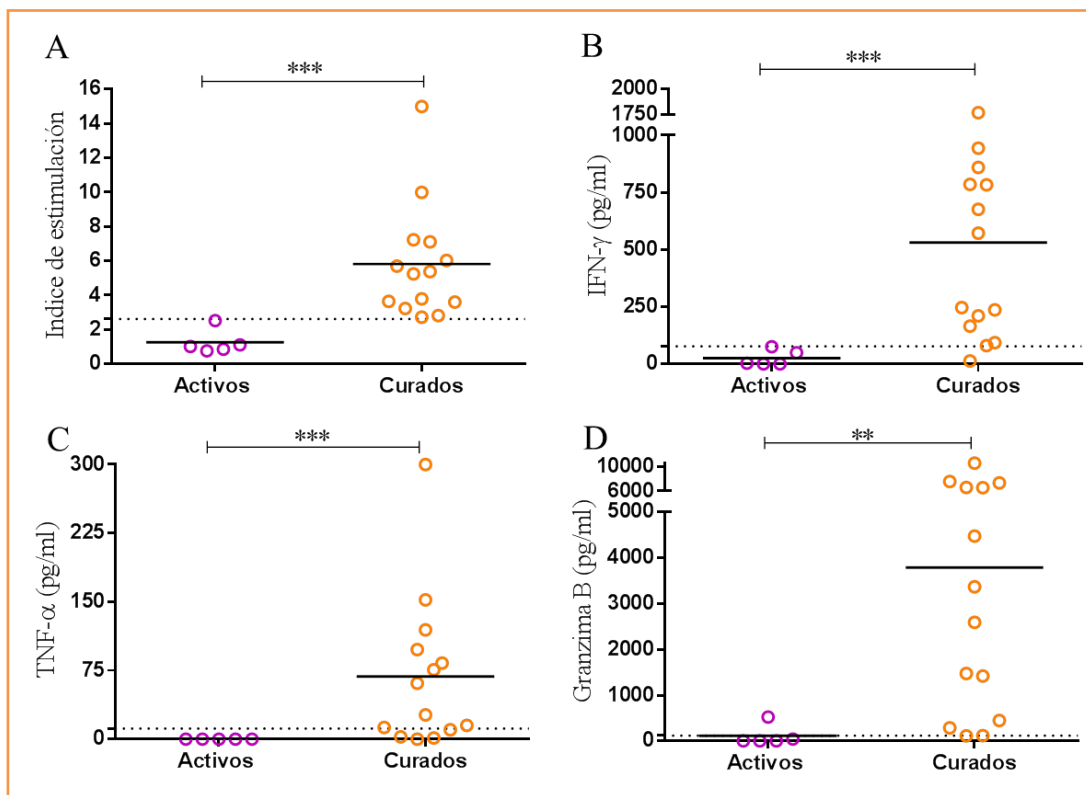
Tras el análisis estadístico comparativo de los resultados obtenidos en los pacientes activos frente a los pacientes curados en relación a la respuesta linfoproliferativa, encontramos diferencias significativas entre ambos grupos ( $p= 0.0002$ ) (Figura 33 A).

Siendo la respuesta linfoproliferativa nuestro test de referencia, calculamos empleando la curva ROC la sensibilidad y la especificidad que presentaban la producción de citoquinas y granzima B. Encontramos que ninguna de ellas resulta igual de sensible que la respuesta linfoproliferativa, siendo igual de específicas (tabla 11a anexos, página 156).

Ninguno de los pacientes con enfermedad activa presentó secreción IFN- $\gamma$  ni de TNF- $\alpha$ , presentando 1 de ellos producción de granzima B. De los pacientes curados, 13 de los 14 presentaban una producción específica de IFN- $\gamma$  y de granzima B (Figura 33 B y D), además 10 de ellos también producían específicamente TNF- $\alpha$  (Figura 33 C). Al comparar los resultados con los obtenidos en los pacientes con leishmaniasis visceral

activa puede verse que existen diferencias significativas (IFN- $\gamma$   $p=0.0007$ ; TNF- $\alpha$   $p=0.009$ ; GB  $p=0.002$ ).

La producción media de IFN- $\gamma$  en los pacientes curados fue de 531,11 pg/ml, frente a una producción media de 25,56 pg/ml que mostraron los pacientes con enfermedad activa. En el caso de la producción media de TNF- $\alpha$  en los pacientes curados fue de 68,46 pg/ml, en contraste con la de los pacientes con enfermedad activa que fue de 0,10 pg/ml. En el caso de la granzima B la producción media en los pacientes curados fue de 3788,96 pg/ml, frente a 114,12 pg/ml que mostraron los pacientes con enfermedad activa.



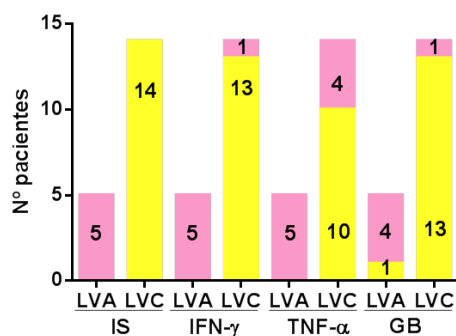
**Figura 33.** (a) Índice de estimulación de las PBMCs estimuladas con SLA de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa y curada. Producción de citoquinas tras la estimulación con SLA de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa y curada (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.

Ninguno de los pacientes presentó secreción de IL-10 o IL-17 ni en el momento activo ni en el momento curado.

En los pacientes en los que se pudo obtener muestra del momento activo y del momento curado ( $n=5$ ) pudo verse no solo que el índice de estimulación pasa de negativo a positivo aumentando de manera significativa ( $p=0,002$ ), sino que la producción

específica de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B aumentan de manera significativa tras la cura (p=0,002) (figura 3a anexos, página 160).

La característica principal de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente que desarrollan una respuesta inmune celular efectiva frente al parásito es el desarrollo de una respuesta linfoproliferativa positiva frente al antígeno SLA (Figura 34).



**Figura 34.** Número de casos negativos (rosa) y positivos (amarillo) de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa (LVA) y con leishmaniasis visceral curada (LVC) en relación al índice de estimulación (IS) y la producción en los sobrenadantes de cultivo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B (GB).

#### 4.2.2.2 Seguimiento de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral

En los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente es necesario realizar un seguimiento clínico estrecho, debido a las enfermedades autoinmunes que padecen. En nuestro trabajo, realizamos el seguimiento de la respuesta inmune celular frente a *Leishmania* de siete de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral.

Para llevar a cabo este seguimiento se empleó la respuesta linfoproliferativa, ya previamente lo habíamos establecido como nuestro test de referencia, y la producción específica de IFN- $\gamma$ , ya que fue la citoquina que presentó mejor sensibilidad y especificidad (tabla 11a anexos, página 156).

Los pacientes 1, 5 y 6 son capaces de desarrollar una respuesta inmune específica frente al parásito entre tres y seis meses después del tratamiento de la leishmaniasis visceral, manteniendo la respuesta inmune generada a lo largo del tiempo (Tabla 10).

En los pacientes 3 y 4 el desarrollo de la respuesta inmune específica frente al parásito no se produce hasta el mes 9 tras el tratamiento (Tabla 10). Este retraso en el desarrollo de inmunidad puede encontrarse influido porque en el paciente 3 no se retiró el

tratamiento inmunosupresor durante el tratamiento de la leishmaniasis y en el paciente 4 se reintrodujo solo 15 días después de finalizarlo (Tabla 5a anexos, página 153).

	Índice de estimulación						Estatus
	Activo	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	24 meses	
Pac 1 IS F	0,86		7,12		5,69		Sin recaída
Pac 2 IS F	0,77	5,71	8,24		1,29		Recaída
Pac 3 IS F	2,52		1,64	3,23			Sin recaída
Pac 4 IS F	1,11		1,12	6,03		2,64	Sin recaída
Pac 5 IS F	1,02		3,64		5,08		Sin recaída
Pac 6 IS F		2,82	6,48			6,99	Sin recaída
Pac 7 IS F				15,00		1,10	Recaída

	IFN- $\gamma$						Estatus
	Activo	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	24 meses	
Pac 1 IS F	0,00		93,72		98,96		Sin recaída
Pac 2 IS F	0,00	246,84	9,85		3,87		Recaída
Pac 3 IS F	49,10		0,00	165,41			Sin recaída
Pac 4 IS F	3,57		0,00	1768,33		203,21	Sin recaída
Pac 5 IS F	75,13		675,84		1896,41		Sin recaída
Pac 6 IS F		859,74	85,53			368,53	Sin recaída
Pac 7 IS F				782,85		3,19	Recaída

**Tabla 10.** Seguimiento a lo largo del tiempo de 7 pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) que tuvieron leishmaniasis visceral. En rojo se muestran los datos negativos de la respuesta linfoproliferativa expresada como índice de estimulación y producción, en verde se muestran los datos positivos.

Cabe destacar el caso concreto del paciente 2 (Tabla 10, Pac 2 ISF) y del paciente 7 (Tabla 10, Pac 7 ISF) que 12 y 24 meses, respectivamente, después de la cura clínica de la enfermedad presentaron un índice de estimulación negativo y una producción de IFN- $\gamma$  negativa. Ambos pacientes sufrieron una recaída de la leishmaniasis visceral pasados 8 meses y una semana después, respectivamente, de la toma de la muestra analizada.

#### 4.2.3 Caracterización molecular, serológica y celular de los pacientes infectados por el VIH con leishmaniasis visceral activa y curada

Para caracterizar la respuesta inmune antes y tras el tratamiento de pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*, se analizaron 5 muestras correspondientes a dos pacientes VIH+ con leishmaniasis visceral activa (cuatro recaídas de uno de ellos) y 10 pacientes VIH+ con leishmaniasis visceral curada.

## Resultados

En estos pacientes se considera el momento de la cura clínica como la ausencia de clínica más de tres meses después del tratamiento, siendo necesario administrarles ciclos de profilaxis secundaria de manera periódica.

En el caso de la enfermedad activa (o momento recaída), 3 de los 5 pacientes presentan PCR positiva con carga parasitaria detectable por qPCR. Tras la cura clínica de la enfermedad el paciente 9 y el 10 continúan con Ln-PCR positiva y carga parasitaria detectable (Tabla 11).

Los datos de IFI y ELISA obtenidos muestran que en el momento de enfermedad activa (LVA) (o momento recaída) estas pruebas son positivas en los 5 casos. Tras la cura clínica (LVC) hay 7 pacientes en los que ambas pruebas continúan siendo positivas, 2 en las que ambas fueron negativas y 1 en el que el IFI fue negativo mientras que el ELISA fue positivo (Tabla 11).

Los resultados obtenidos con el test rk39-ICT muestran que en el momento de enfermedad activa todos presentan un resultado del test positivo. Tras la cura clínica el resultado es positivo en 5 de los pacientes (Tabla 11).

Pac VIH	Estado	Respuesta linfoproliferativa		Ln-PCR	qPCR (p/ug DNA)	IFI (título)		ELISA (D.O.)		rk39-ICT
		Opt	Res			Opt	Res	Opt	Res	
Pac VIH 1	LVC	6,145	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,030	NEG	NEG
Pac VIH 2	LVC	4,988	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,438	POS	POS
Pac VIH 3	LVC	8,693	POS	NEG	NEG	1/160	POS	0,435	POS	NEG
Pac VIH 4	LVC	7,415	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,176	POS	NEG
Pac VIH 5	LVC	4,645	POS	NEG	NEG	1/80	POS	0,256	POS	NEG
Pac VIH 6	LVC	4,608	POS	NEG	NEG	< 1/40	NEG	0,049	NEG	NEG
Pac VIH 7	LVC	1,111	NEG	NEG	NEG	1/80	POS	0,365	POS	POS
Pac VIH 8	LVA	0,854	NEG	POS	7,690	1/160	POS	1,287	POS	POS
	LVA	0,931	NEG	NEG	NEG	1/160	POS	1,541	POS	POS
	LVA	1,188	NEG	POS	1,063	1/160	POS	1,571	POS	POS
	LVA	2,113	NEG	NEG	NEG	1/160	POS	1,773	POS	POS
	LVC	4,116	POS	NEG	NEG	1/160	POS	1,177	POS	POS
Pac VIH 9	LVC	1,036	NEG	POS	3326,436	1/160	POS	1,455	POS	POS
Pac VIH 10	LVA	0,887	NEG	POS	3275,620	1/320	POS	3,101	POS	POS
	LVC	1,249	NEG	POS	10270,473	1/80	POS	0,155	POS	POS

**Tabla 11.** Resultado de la respuesta linfoproliferativa, Ln-PCR, qPCR (parásitos/μg DNA), IFI, ELISA (D.O: densidad óptica) y rk39-ICT de los pacientes infectados por el VIH con leishmaniasis visceral activa (LVA) y leishmaniasis visceral curada (LVC).

Mediante el análisis de la curva ROC se obtuvo que la respuesta linfoproliferativa frente al antígeno SLA es 94,44 sensible y 100% específica (tabla 12a anexos, página 156), con un valor de punto de corte de 2,381.

Como ocurría en el caso de los pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos farmacológicamente, los pacientes VIH+ con leishmaniasis visceral activa presentaban una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación frente al antígeno SLA negativo. En el caso de estos pacientes, tras la cura clínica de la enfermedad la respuesta linfoproliferativa presentaba índice de estimulación positivo en 7 de los 10. A pesar de la inmunosupresión causada por el virus, todos los pacientes presentaban una respuesta linfoproliferativa frente a la PHA (tabla 13a anexos, página 157).

#### **4.2.3.1 Estudio de la secreción específica de citoquinas en los pacientes infectados por el VIH con leishmaniasis visceral activa y curada**

Dentro del objetivo de caracterizar la respuesta inmune frente a *Leishmania* de pacientes infectados por el VIH, con leishmaniasis visceral activa y curada, estudiamos el perfil de citoquinas y granzima B que estos pacientes presentaban.

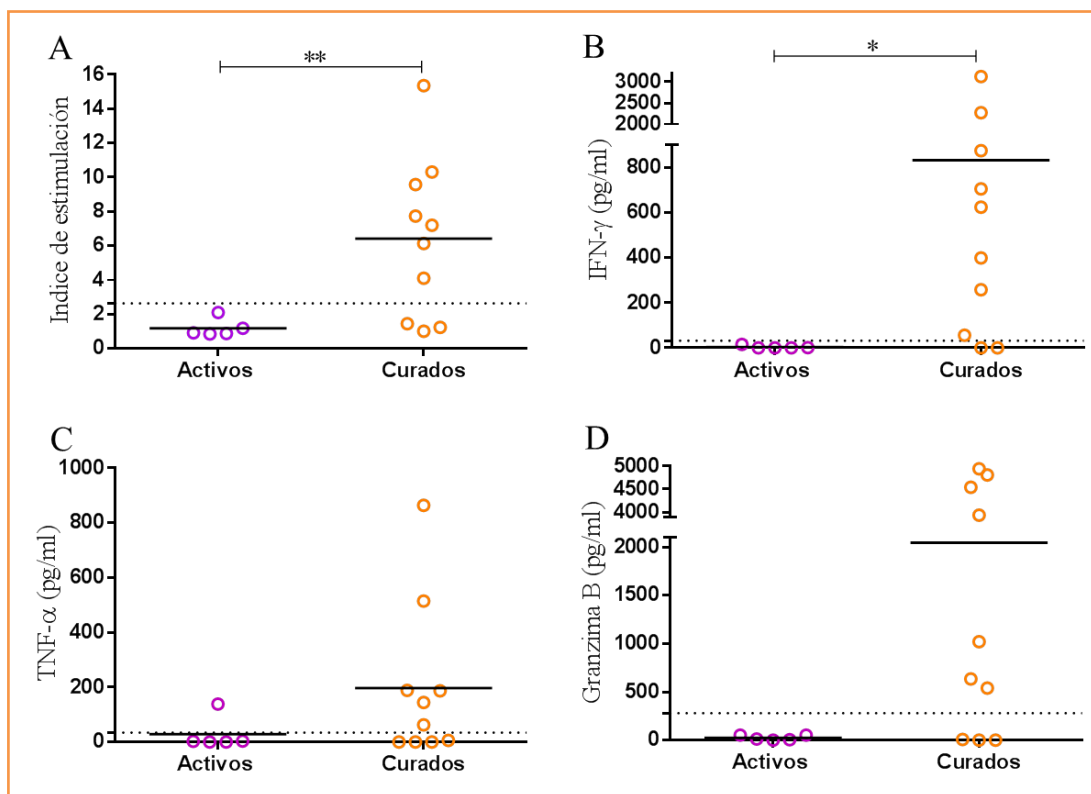
En la figura 35A se encuentra representada la respuesta linfoproliferativa, expresada como índice de estimulación, de los pacientes activos y los pacientes curados, encontrándose que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0.008$ ).

El análisis de la curva ROC, demostró que la producción de IFN- $\gamma$  presenta una sensibilidad mejor, del 96,75%, que la respuesta linfoproliferativa para establecer la cura en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* (tabla 12a anexos, página 156).

Ninguno de los pacientes con enfermedad activa presentaba producción específica de IFN- $\gamma$  ni de granzima B, solamente uno presentaba producción de TNF- $\alpha$  tras la cuantificación de los niveles en los sobrenadantes de cultivo (Figura 35 B-D). Observamos que 8 de los 10 pacientes curados presentaban una secreción específica de IFN- $\gamma$  (Figura 35B), que en 6 de los pacientes viene acompañada también de una secreción específica de TNF- $\alpha$  y en 7 granzima B (Figura 35 C y D). Al comparar los resultados con los obtenidos en los pacientes con leishmaniasis visceral activa puede verse que existen diferencias significativas en los niveles de IFN- $\gamma$  ( $p=0.036$ ).

## Resultados

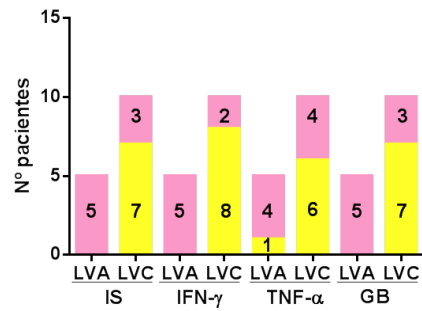
La producción media de IFN- $\gamma$  en los pacientes curados fue de 831,29 pg/ml, frente a una producción media de 3,61 pg/ml que mostraron los pacientes con enfermedad activa. En el caso de la producción media de TNF- $\alpha$  en los pacientes curados fue de 196,95 pg/ml, en contraste con la producción media de los pacientes con enfermedad activa que fue de 29,09 pg/ml. En el caso de la granzima B la producción media en los pacientes curados fue de 2043,85 pg/ml, frente a la producción media de 25,27 pg/ml que mostraron los pacientes con enfermedad activa.



**Figura 35.** (a) Índice de estimulación de las PBMCs estimuladas con SLA de los pacientes infectados con el VIH con leishmaniasis visceral activa y curada. Producción de citoquinas tras la estimulación con SLA de los pacientes infectados con el VIH con leishmaniasis visceral activa y curada (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.

Ni en el momento activo de la enfermedad ni en el momento curado se detectó secreción de IL-10 ni de IL-17 en los pacientes estudiados.

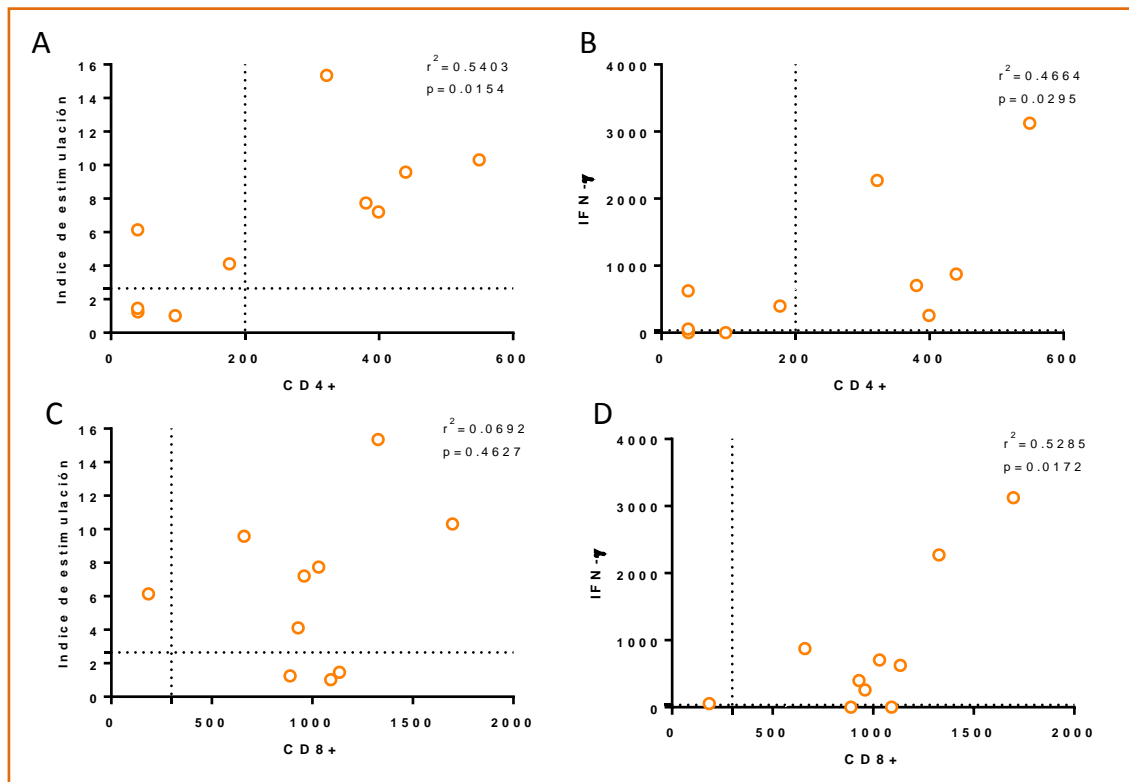
En el caso de los pacientes incluidos en nuestro estudio coinfectados VIH-*Leishmania* la cura de la leishmaniasis visceral se relaciona con una producción específica de IFN- $\gamma$  que puede ir acompañada de una respuesta linfoproliferativa frente al SLA positiva (Figura 36).



**Figura 36.** Número de casos negativos (rosa) y positivos (Amarillo) de los pacientes VIH+ con leishmaniasis visceral activa (LVA) y con leishmaniasis visceral curada (LVC) en relación al índice de estimulación (IS) y la producción en los sobrenadantes de cultivo de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y granzima B (GB).

No existe consenso sobre la retirada y el mantenimiento de la profilaxis secundaria en los pacientes VIH+ curados de leishmaniasis. Uno de los predictores que se han utilizado tradicionalmente es el número de linfocitos TCD4+, estableciéndose que es necesaria la profilaxis secundaria cuando estos se encuentran por debajo de 200 células/mm<sup>3</sup>.

Con el fin de establecer si la respuesta inmune celular que hemos caracterizado en nuestra población de pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*, es dependiente de los niveles de linfocitos TCD4+ y TCD8+ se estudió si existía o no correlación entre estos parámetros.



**Figura 37.** (a) Correlación del índice de estimulación con el nivel de linfocitos TCD4+, (b) de los niveles de IFN- $\gamma$  con el nivel de linfocitos TCD4+, (c) del índice de estimulación con el nivel de linfocitos TCD8+, (d) de los niveles de IFN- $\gamma$  con el nivel de linfocitos TCD8+ de los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* clínicamente curados.

En la población de pacientes clínicamente curados coinfectados VIH-*Leishmania* que hemos estudiado la respuesta inmune desarrollada frente al parásito es independiente de los niveles de linfocitos TCD4+ y de los niveles de linfocitos TCD8+. Esto se ve con la débil correlación que hay entre el índice de estimulación y los niveles de TCD4+ y de TCD8+ (Figura 37 A y C); y la débil correlación entre el IFN- $\gamma$  y los niveles de TCD4+ y de TCD8+ (Figura 37 B y D).

### 4.2.3.2 Seguimiento de los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*

En los pacientes infectados por el VIH la necesidad de acudir al hospital para el control de la carga vírica y para recoger el tratamiento antirretroviral, nos permitió realizar el seguimiento de la respuesta inmune frente a *Leishmania* de 5 pacientes VIH+ que habían sufrido leishmaniasis visceral.

Debido a que habíamos comprobado que la respuesta linfoproliferativa y la producción específica de IFN- $\gamma$  eran las técnicas que mejor sensibilidad y especificidad mostraban (tabla 11a anexos, página 156), el seguimiento se realizó empleando ambas.

El paciente 6 desarrolla una respuesta inmune patente y efectiva frente al parásito, caracterizada por una respuesta linfoproliferativa positiva y la producción de IFN- $\gamma$ . Esto ha permitido la retirada de la profilaxis secundaria sin recaídas hasta la fecha (56 meses desde la retirada de la profilaxis).

En el caso del paciente 7 no es capaz de desarrollar una respuesta linfoproliferativa positiva, sin embargo existe una producción de IFN- $\gamma$  que al mantenerse constante a lo largo del tiempo ha permitido la retirada de la profilaxis secundaria sin recaídas hasta la fecha (16 meses desde la retirada de la profilaxis).

El paciente 8 no es capaz de desarrollar una respuesta inmune frente al parásito durante los primeros meses, lo que provoca que aun administrándosele profilaxis secundaria sufra varios episodios de recaídas. 33 meses después del primer episodio activo de LV y 3 desde la última recaída, el paciente presenta una respuesta linfoproliferativa positiva acompañada de una producción de IFN- $\gamma$ , que permite la retirada de la profilaxis secundaria sin recaídas hasta la fecha (23 meses desde la retirada de la profilaxis).

Ni el paciente 9 ni el 10 son capaces de desarrollar una respuesta inmune celular específica frente al parásito, lo que no hace posible la retirada de la profilaxis secundaria debido al alto riesgo de recaída que presentan.

	Índice de estimulación											
	Activo	11 meses	16 meses	19 meses	24 meses	26 meses	29 meses	31 meses	33 meses	37 meses	42 meses	59 meses
Pac 6 VIH					4,61	3,31	4,86			7,74		
Pac 7 VIH		1,11					1,01	1,50	1,14	1,07	1,46	1,06
Pac 8 VIH		0,85	0,93	1,06	1,08	1,38		2,11	4,12			
Pac 9 VIH			1,04			0,89		1,04		1,22	1,02	1,78
Pac 10 VIH	0,89			1,07		0,85		1,25				

	IFN- $\gamma$											
	Activo	11 meses	16 meses	19 meses	24 meses	26 meses	29 meses	31 meses	33 meses	37 meses	42 meses	59 meses
Pac 6 VIH					2743,19	557,59	4023,58			704,72		
Pac 7 VIH		470,21					47,44	1184,48	100,21	4993,41	624,19	220,59
Pac 8 VIH		1,54	0,95	0,69	2,79	76,44		15,51	398,37			
Pac 9 VIH			0,00			0,00		0,00		0,00	0,00	0,00
Pac 10 VIH	0,00			0,00		0,00		0,00				

**Tabla 12.** Seguimiento a lo largo del tiempo de 5 pacientes infectados por el VIH que tuvieron leishmaniasis visceral. En rojo se muestran los datos negativos de la respuesta linfoproliferativa expresada como índice de estimulación y producción de IFN- $\gamma$ , en verde se muestran los datos positivos.

Debido a que en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* la profilaxis secundaria se administra de manera periódica, estudiamos dos muestras separadas en el tiempo de los 10 pacientes VIH+ que sufrieron leishmaniasis visceral, con el objetivo de comprobar si la respuesta inmune celular que presentaban se mantenía en el tiempo y estudiar si se podía retirar la profilaxis secundaria cuando los pacientes desarrollaban esta respuesta.

En la tabla 13 se muestra los resultados de los 10 pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* en el momento de la toma de la primera muestra y de la última. A tres de los pacientes (Pac VIH 1, 2 y 3) ya se les había retirado la profilaxis secundaria en el momento de la toma de la primera muestra (estatus basal) presentando una respuesta inmune celular frente al parásito positiva que se mantiene años después de la retirada de la profilaxis.

Seis de los diez pacientes se encontraban en profilaxis secundaria (Pac 4 a 9) y en el momento de la enfermedad activa en el caso del paciente 10, sin haberle administrado aún tratamiento frente a la leishmaniasis en el momento de la toma de la muestra. Puede verse que tres de estos pacientes (Pac 4 a 6) son capaces de desarrollar una respuesta inmune celular específica frente a *Leishmania*, que se mantiene a lo largo del tiempo y se caracteriza por una respuesta linfoproliferativa positiva (índice de estimulación mayor de 2,381) y una producción específica de IFN- $\gamma$  (concentración mayor de 31,48 pg/ml).

Cabe destacar el caso del paciente 7, que en ninguna de los análisis realizados presenta una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación positivo, sin embargo sí

que presenta una producción específica de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo. Esta producción permite la retirada de la profilaxis secundaria en este paciente.

El desarrollo de una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación positivo y la producción específica de IFN- $\gamma$  que presenta el paciente 8, permite que en este paciente también se le retire la profilaxis secundaria.

	Estatus basal	TCD4+ (mm <sup>3</sup> )	Índice de estimulación	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	qPCR (p/ug DNA)	Estatus	Índice de estimulación	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	qPCR (p/ug DNA)	TCD4+ (mm <sup>3</sup> )	Mantenimiento Profilaxis	Tiempo sin recaídas ni profilaxis
Pac VIH 1	Sin profilaxis	39,74	6,15	56,53	NEG	Sin profilaxis	4,63	147,61	NEG	284,97	NO	7 años 7 meses
Pac VIH 2	Sin profilaxis	644,80	4,99	997,85	NEG	Sin profilaxis	9,59	874,35	NEG	439,70	NO	6 años 7 meses
Pac VIH 3	Sin profilaxis	213,65	8,69	2834,07	NEG	Sin profilaxis	7,21	257,63	NEG	399,33	NO	11 años 2 meses
Pac VIH 4	En profilaxis	669,58	7,42	995,38	NEG	Sin profilaxis	7,17	4463,94	NEG	624,77	NO	6 años
Pac VIH 5	En profilaxis	234,36	4,65	2436,11	NEG	Sin profilaxis	15,35	2270,62	NEG	321,90	NO	5 años 1 mes
Pac VIH 6	En profilaxis	187,26	4,61	2743,19	NEG	Sin profilaxis	7,74	704,72	NEG	380,59	NO	4 años 8 meses
Pac VIH 7	En profilaxis	77,76	1,11	470,21	NEG	En profilaxis	1,06	220,59	NEG	39,75	NO	1 año 4 meses
Pac VIH 8	En profilaxis	63,88	1,67	0,00	338	En profilaxis	4,12	398,37	NEG	176,68	NO	1 año 11 meses
Pac VIH 9	En profilaxis	208,75	1,04	0,00	3326	En profilaxis	1,78	0,00	3449	95,82	SI	En profilaxis
Pac VIH 10	LV activa	1,38	0,89	0,00	3276	En profilaxis	1,25	0,00	1663	40,20	SI	En profilaxis

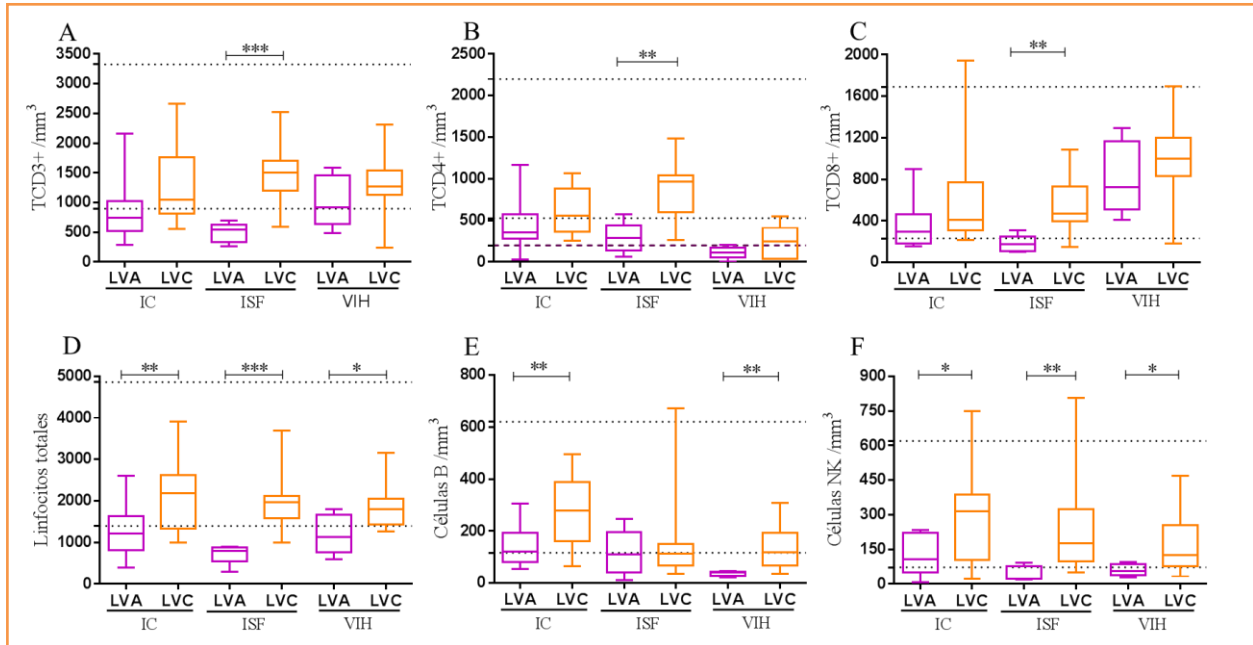
**Tabla 13.** Datos de las dos tomas de muestra, separadas en el tiempo de los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* con respecto al: número de TCD4+ (verde >200 cls/mm<sup>2</sup>), respuesta linfoproliferativa expresada mediante el índice de estimulación (verde positivo, amarillo negativo), producción específica de IFN- $\gamma$  (verde positiva, amarillo negativa) qPCR (rojo positiva: cuantificación del número de parásitos).

En los 8 pacientes que, tras el tratamiento, han sido capaces de desarrollar una respuesta inmune celular específica frente al parásito mantenida a lo largo del tiempo caracterizada por la producción específica de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo estimulados con el antígeno SLA, se ha podido retirar la administración de la profilaxis secundaria, sin recaídas hasta la fecha habiendo pasado como mínimo 1 año y 4 meses desde la retirada de la profilaxis al último paciente.

#### 4.2.4 Estudio de las subpoblaciones linfocitarias circulantes de los pacientes con leishmaniasis visceral activa y curada inmunocompetentes, inmunosuprimidos farmacológicamente e infectados por el VIH

Se sabe que la infección por *Leishmania* en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos provoca una depleción generalizada de las distintas poblaciones celulares. Con el objetivo de conocer los valores de las distintas subpoblaciones celulares que presentan todos los pacientes estudiados y, si existen diferencias entre el estado activo y curado de la enfermedad, se evaluaron los niveles de las subpoblaciones celulares en sangre completa.

Al analizar los niveles de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células B, células NK y linfocitos totales, los resultados demostraron que existe una depleción generalizada de las subpoblaciones celulares en el momento de la enfermedad activa de los tres grupos de pacientes estudiados (Figura 38).



**Figura 38.** (a) Niveles de linfocitos T CD3+, (b) T CD4+, (c) T CD8+, (d) linfocitos totales, (e) células B y (f) células NK de los pacientes con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC) inmunocompetentes (IC), inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) e infectados por el VIH (VIH). Líneas punteadas negras: límites de normalidad de las poblaciones celulares establecidos en la práctica clínica. Línea roja: linfocitos TCD4+ 200 células/mm<sup>3</sup>.

Al analizar los niveles de la subpoblación de células NK-T observamos que no existen diferencias entre el momento de la enfermedad activa y la cura clínica en ninguno de los grupos estudiados (figura 1a anexos, página 158).

Tras la cura de la enfermedad se observa que hay una recuperación de los niveles celulares en todos los grupos de manera generalizada, alcanzándose valores que se encuentran dentro de los rangos de normalidad.

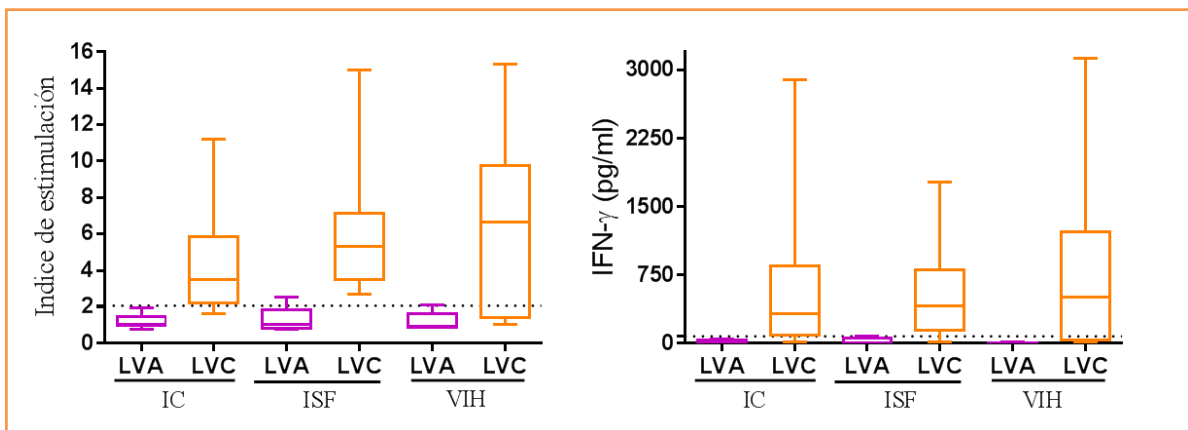
Esta recuperación no es tan patente en el caso de las células B de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, pudiéndose deber a un efecto del tratamiento inmunosupresor al que se encuentran sometidos. Además, los sujetos infectados por el VIH, a pesar de estar en terapia antirretroviral con buena adherencia, no son capaces de restablecer el número de linfocitos TCD4+.

#### 4.2.5 Resumen de las características generales de los pacientes con leishmaniasis visceral activa y curada

Nuestros resultados muestran que tanto los pacientes inmunocompetentes, como los inmunosuprimidos farmacológicamente como los infectados por el VIH que tras sufrir leishmaniasis visceral reciben un tratamiento efectivo, son capaces de desarrollar una respuesta inmune celular de tipo Th1 frente al parásito.

Esta respuesta inmune celular se caracteriza por presentar una respuesta linfoproliferativa con un índice de estimulación positivo en los pacientes curados y una producción específica de IFN- $\gamma$ .

Aunque solamente la respuesta linfoproliferativa frente al antígeno SLA ha resultado ser 100% sensible y específica en el caso de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, en los tres grupos hemos podido relacionar la ausencia de la respuesta inmune celular con la aparición de recaídas de la enfermedad activa.



**Figura 39.** Respuesta linfoproliferativa y producción específica de IFN- $\gamma$  tras la estimulación con SLA de los sujetos: inmunocompetentes (IC) con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC); inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC); infectados por el VIH (VIH) con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC).

---

## DISCUSIÓN

---



## 5. Discusión

### 5.1 Medida de la respuesta inmune celular para la identificación de sujetos asintomáticos

La mayoría de las infecciones causadas por *Leishmania* son asintomáticas, lo que dificulta las estrategias de control y eliminación de la leishmaniasis (Singh, Hasker et al. 2014).

Es importante destacar que aún se desconoce el papel que estos sujetos asintomáticos juegan en la transmisión del parásito (Singh, Hasker et al. 2014). Mediante modelos matemáticos se ha sugerido que estos sujetos mantienen la transmisión del parásito (Stauch, Sarkar et al. 2011, Le Rutte, Coffeng et al. 2016). Para establecer si los portadores asintomáticos son infecciosos para los flebótomos, actualmente se están llevando a cabo estudios de xenodiagnóstico en India y Bangladesh (Chakravarty, Hasker et al. 2019), sin datos publicados hasta la fecha.

Tampoco se conocen con claridad los factores implicados en el desarrollo de la enfermedad clínica desde la infección asintomática (Singh, Hasker et al. 2014). El estudio reciente llevado a cabo por Chakravarty y colaboradores propone un título alto de DAT ( $> 1:25600$ ), una alta densidad óptica en el ELISA frente al rk39 y una qPCR positiva como marcadores para identificar a sujetos con mayor riesgo de desarrollo de leishmaniasis visceral (Chakravarty, Hasker et al. 2019).

Las respuestas desarrolladas por un hospedador inmunocompetente asintomático son suficientes para mantener la infección latente bajo control. No obstante, existen diferentes factores de riesgo que se han reportado para la activación de la infección asintomática entre los que se incluyen la administración de agentes modificantes de la respuesta biológica, la infección por el VIH, el trasplante de órganos, diabetes inadecuadamente controlada y el abuso de alcohol (Weisser, Khanlari et al. 2007, van Griensven, Carrillo et al. 2014).

La falta de un test de referencia y de métodos validados para la detección de sujetos asintomáticos ha dificultado la determinación de la extensión real de la infección por *Leishmania* (Reesink 2005, Michel, Pomares et al. 2011)

- Los estudios publicados indican que la medida de anticuerpos circulantes es insuficiente para detectar la infección asintomática por *Leishmania* en áreas endémicas

con parasitemia baja o intermitente (Das, Matlashewski et al. 2014, Ena, Pasquau et al. 2014). Esto es debido a que los sujetos asintomáticos generalmente presentan bajos niveles de anticuerpos y cantidades discretas o indetectables de parásitos circulantes, por lo que los métodos serológicos y moleculares pueden subestimar las tasas de infección en estudios poblacionales.

En un estudio de vigilancia epidemiológica llevado a cabo por nuestro grupo de laboratorio en colaboración con la Comunidad de Madrid en el año 2015, encontramos que el uso combinado de las pruebas serológicas y moleculares arrojan unos datos de prevalencia de la infección asintomática del 1,12% (9/805), mientras que las pruebas celulares demuestran una prevalencia del 20,71% (143/804) en el área endémica de Fuenlabrada (Ibarra-Meneses 2019).

En el caso de los individuos que hemos estudiado en esta tesis, el uso de técnicas serológicas (IFI y ELISA) y moleculares (Ln-PCR) en muestras de sangre completa, de sujetos tanto inmunocompetentes como inmunosuprimidos que residen en una área endémica como es el caso de Fuenlabrada, no nos ha permitido detectar a los sujetos asintomáticos para la infección por *Leishmania infantum*. Esto apoya que el uso exclusivo de estas técnicas para la detección de la infección asintomática, sobre todo cuando se evalúa una pequeña proporción de la población, provoca una subestimación en el reporte de este tipo de infección.

- A diferencia de lo que sucede con la inmunidad humoral, la inmunidad celular generalmente permanece positiva durante varios años, incluso durante toda la vida del individuo (Kar 1995, Werneck, Rodrigues et al. 2002). Es por ello que de manera tradicional se ha utilizado el test en piel de leishmanina (LST) para realizar estudios de prevalencia de infección asintomática.

El estudio llevado a cabo por Gadisa y colaboradores en dos áreas de Etiopía en niños, mostró que el porcentaje de infección asintomática por *Leishmania donovani* que se detecta empleando el LST es similar al que se obtiene utilizando de manera combinada el test DAT y el test rápido rk39-ICT (Gadisa, Custodio et al. 2012). No obstante, la ausencia de buenas prácticas de fabricación -en inglés good manufacturing practice (GMP)- para su producción hace que su uso no esté aprobada en países europeos (incluido en España) y algunos no europeos; además, es una técnica invasiva que provoca sensibilización en el individuo. Por ello, actualmente se están buscando nuevas

aproximaciones para el estudio de la infección asintomática. Se ha visto que existe una buena concordancia (98-100%) entre el LST y los ensayos de proliferación celular frente a antígenos del parásito evaluados *in vitro* en áreas con altas tasas de transmisión (Sassi, Louzir et al. 1999, Carvalho, Aires et al. 2013) (Singh and Sundar 2014). Además, la medida de la producción de IL-2 tras la estimulación de la sangre completa con el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA) ha arrojado resultados prometedores para la detección de infección asintomática en individuos inmunocompetentes (Ibarra-Meneses, Carrillo et al. 2016).

- La inmunosupresión es un factor de riesgo para el desarrollo de leishmaniasis visceral. Por ese motivo, la identificación de sujetos que presenten infección asintomática no es solo importante para conocer la prevalencia real de la infección por *Leishmania*, sino que existen argumentos a favor del cribado de la infección asintomática en individuos inmunocompetentes previo al inicio del tratamiento inmunosupresor (ya sea a causa de enfermedades autoinmunes o por el trasplante de órgano sólido).

De manera rutinaria en pacientes inmunocompetentes que van a ser sometido a un tratamiento inmunosupresor se realiza un cribado de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En el caso de que el paciente presente una tuberculosis latente, se le administra una profilaxis con isoniacida durante 6 a 9 meses o rifampicina más isoniacida durante 3 meses (Gomez-Reino, Carmona et al. 2007, Nisar, Rafiq et al. 2015), para evitar que desarrolle la enfermedad activa. La buena adherencia a estos tratamientos reduce significativamente el riesgo de desarrollar tuberculosis.

En la actualidad, no se realiza ningún tipo de cribado de la infección por *Leishmania*, aun sabiéndose que los pacientes inmunosuprimidos presentan mayor riesgo de activación de la infección latente. La identificación de individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad, puede resultar beneficiosa en los programas de intervención y eliminación (Vallur, Duthie et al. 2014).

### **5.1.1 Individuos inmunocompetentes**

En este estudio, la utilización de la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA), nos ha permitido determinar que una parte importante de la población inmunocompetente residente en

Fuenlabrada es asintomática para la infección por *Leishmania*. Además todos estos sujetos asintomáticos son capaces de producir de manera específica IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Es importante destacar que, en el último manual publicado para la OMS se recomienda el uso de la estimulación de PBMCs con el antígeno SLA en combinación con la detección de citoquinas específicas para la caracterización de la respuesta inmune celular frente a *Leishmania* en individuos inmunocompetentes, además de presentar potencial para sustituir al LST (Gradoni L 2017 ). Además, esta técnica tiene la ventaja de permitir la medida de la respuesta inmune en repetidas ocasiones ya que evitan la sensibilización que se genera en el sujeto cuando se utiliza el LST.

A la vista de los resultados obtenidos consideramos que la evaluación de la respuesta linfoproliferativa frente al antígeno SLA, es una buena herramienta para la detección de individuos inmunocompetentes con infección asintomática por *Leishmania*, pudiendo aplicarse para estudios de detección de este tipo de infección en pacientes que van a ser sometidos a terapias inmunosupresoras.

### 5.1.2 Individuos inmunosuprimidos farmacológicamente

La administración de un tratamiento anti-TNF puede provocar la reactivación de una enfermedad latente en infecciones como la tuberculosis (Roach, Bean et al. 2002, Ehlers 2003). Ya que tanto *Leishmania* spp. como *Mycobacterium* spp. se hospedan en el mismo tipo de células y están controladas por una respuesta inmune similar, puede preverse que la neutralización del TNF aumenta la susceptibilidad al desarrollo de enfermedad activa tras la infección por *Leishmania* (Singh, Kumar et al. 2016).

- En nuestro estudio hemos encontrado una población de sujetos en tratamiento inmunosupresor con distintos fármacos -incluidos neutralizadores del TNF- a causa de distintas enfermedades autoinmunes, que son capaces de generar una respuesta inmune tipo Th1, protectora frente al desarrollo de la forma clínica de la enfermedad y en consecuencia permanecen asintomáticos.

- En el caso de los pacientes en tratamiento inmunosupresor incluidos en este trabajo, midiendo de manera exclusiva la proliferación celular frente al SLA, encontramos un 27% de nuestra población que presenta una respuesta situada en el límite del punto de corte de la técnica. La medida de la producción específica de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo permitió establecer a aquellos que presentaban una

infección asintomática. Es más, esta producción específica de IFN- $\gamma$  resultó 100% sensible y específica para detectar a los sujetos asintomáticos con respecto a la técnica de linfoproliferación.

Esta es la primera vez que se estudia una cohorte tan amplia sometida a tratamiento con fármacos frente a la unión del receptor del TNF residente en zona endémica que presenta infección asintomática por *Leishmania*. Estos sujetos -debido a la inmunosupresión farmacológica- presentan un mayor riesgo de desarrollar la forma clínica de la enfermedad. Es por ello que proponemos la posibilidad de monitorizar a estos sujetos a lo largo del tiempo con el fin de prevenir el desarrollo de leishmaniasis visceral.

### 5.1.3 Individuos infectados por VIH

La infección por el VIH incrementa el riesgo de desarrollar LV de 100 a 2300 veces en áreas endémicas, sin embargo una parte variable de los casos permanecen asintomáticos (Who 2010). En España, la coinfección VIH-*Leishmania* es el cuarto factor más importante en la progresión hacia el estado de SIDA, representando estos pacientes 1/3 de los casos de leishmaniasis visceral. Sin embargo, actualmente no se evalúa la posible infección asintomática por *Leishmania* en zonas endémicas, a pesar de que los pacientes VIH+ tienen mayor riesgo de desarrollar LV si se infectan.

- Mediante el estudio de la respuesta inmune celular, en este trabajo hemos podido caracterizar a un grupo de sujetos VIH+ con infección asintomática por *Leishmania*, cuya principal característica es que son capaces de generar una respuesta inmune tipo Th1 frente al parásito. Los sujetos VIH+ que hemos estudiado en este trabajo, se encuentran en tratamiento TARGA con buena adherencia y respuesta, lo que favorece una mejora de la inmunidad celular de estos individuos. Todo lo anterior ha podido contribuir a que, aun cuando se encuentran expuestos a la infección por *Leishmania infantum*, permanezcan asintomáticos.

Nuestros resultados muestran que la medida de la proliferación celular de las PBMCs frente al antígeno SLA, es un marcador 100% sensible y específico de la infección asintomática en los individuos VIH+. Estos sujetos también se caracterizan por producir de manera específica IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo celular.

- En la infección asintomática por *Leishmania* no se aplica un tratamiento preventivo, debido a que la toxicidad de los medicamentos actuales no justifica su uso en individuos asintomáticos (Who 2010). Sin embargo, el mayor riesgo que presentan los individuos inmunosuprimidos de desarrollar la enfermedad activa, pone de manifiesto la necesidad de monitorizar su respuesta celular frente al parásito a lo largo del tiempo.

En este sentido, hemos llevado a cabo un estudio preliminar de seguimiento en parte de los sujetos inmunosuprimidos asintomáticos. Los datos preliminares muestran que la respuesta inmune celular que hemos caracterizado en la primera muestra se mantiene en el tiempo (dos años de seguimiento) sin que ninguno desarrolle la enfermedad activa. Sin embargo, desconocemos si la pérdida de la inmunidad se asocia con la enfermedad activa.

Nuestros resultados muestran la necesidad de llevar a cabo un seguimiento prolongado de los pacientes inmunosuprimidos asintomáticos, independientemente del agente causal de la inmunosupresión, con el fin de predecir aquellos que pueden llegar a desarrollar leishmaniasis visceral. El estudio de la respuesta linfoproliferativa y de la producción de IFN- $\gamma$  de manera específica por las PBMCs en respuesta al antígeno del parásito, son una buena herramienta que permiten llevar a cabo este seguimiento a partir de la toma de una muestra poco invasiva y sin sensibilizar al individuo estudiado.

Los estudios que hemos llevado a cabo, se limitan a análisis en muestras de sangre completa. La falta de detección de parásitos en sangre completa no significa necesariamente que no se encuentren en los órganos diana del parásito (bazo, hígado o médula ósea), pudiendo dar lugar en algún momento a la reactivación de la enfermedad (van Griensven, Carrillo et al. 2014). Las condiciones de inmunosupresión son el factor de riesgo individual principal para que esta activación se produzca; sin embargo, la toma de muestra de esos órganos es un procedimiento invasivo que no justifica su extracción en sujetos sanos. Además, residir en una zona de alta endemicidad aumenta el riesgo de exposición a la picadura del vector y la probabilidad de una nueva infección con el parásito.

Para validar estos resultados, es necesario llevar a cabo estudios para la detección de infección asintomática en otras áreas endémicas, en poblaciones con otro tipo de

inmunosupresiones (como las causadas por la malnutrición) y en poblaciones VIH+ cuyas condiciones basales no sean tan favorables.

## **5.2 Medida de la respuesta inmune celular para el seguimiento de pacientes con leishmaniasis visceral**

En ausencia de una vacuna para el uso en humanos, la mejor opción de tratamiento continúa siendo la quimioterapia, que es una medida limitada por su toxicidad, su moderada eficacia y elevado coste (Singh and Sundar 2014).

El tratamiento de la leishmaniasis visceral normalmente es efectivo, sin embargo generalmente no se eliminan por completo los parásitos del organismo (Gupta, Oghumu et al. 2013) y por lo tanto la cura de la LV no es estéril (Khalil, Khidir et al. 2013). En los individuos inmunocompetentes, los parásitos residuales son contenidos por la inmunidad mediada por células, otorgando cierto grado de protección. Sin embargo, en los pacientes VIH+ dependiendo de la situación inmunológica y de la respuesta celular del paciente, este pequeño número de parásitos residuales puede continuar replicándose dando lugar a recaídas de la enfermedad que además son más difíciles de curar (Petter, Shetty-Lee et al. 2001).

Aunque la técnica Ln-PCR logra la detección de parásitos durante la leishmaniasis visceral activa, después de la primera dosis de tratamiento el número de parásitos decae rápidamente (Castro, Carrillo et al. 2016), lo que limita su detección con esta técnica.

Se ha reportado que la respuesta humoral puede mantenerse elevada incluso durante años después de la cura y de un tratamiento eficaz (Bhattarai, Van der Auwera et al. 2009, Gidwani, Picado et al. 2011, Srivastava, Gidwani et al. 2013), debido a la exposición repetida al parásito por la picadura del vector o por la eliminación incompleta del parásito del organismo (Bhattarai, Van der Auwera et al. 2009). Esto hace que la serología no sea recomendable para monitorizar a lo largo del tiempo el resultado del tratamiento. Además, en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* las pruebas serológicas presentan una menor sensibilidad que en los pacientes inmunocompetentes (Gradoni, Scalone et al. 1993, Cota, Gomes et al. 2012, Cota, de Sousa et al. 2013).

- En los diferentes pacientes que hemos estudiado en esta tesis doctoral, los resultados muestran que tras la cura clínica de la enfermedad la PCR es negativa y aun cuando el paciente recae puede ser negativa en sangre durante un periodo de tiempo.

También hemos podido comprobar que los valores de anticuerpos IgG frente a *Leishmania* cuantificados mediante ELISA y mediante IFI, continúan siendo positivos en muchos casos incluso varios meses después de la finalización del tratamiento. Lo mismo sucede cuando se emplea el test rápido rk39. Estos resultados apoyan que estas técnicas serológicas no son de utilidad para establecer la cura de los pacientes o realizar la monitorización de la respuesta al tratamiento a lo largo del tiempo.

- La búsqueda de marcadores en leishmaniasis ha emergido como una necesidad no solo para la identificación de marcadores de susceptibilidad o resistencia a la infección o para la evaluación de vacunas, sino fundamentalmente para monitorizar la efectividad del tratamiento.

Desde hace años, la búsqueda y el desarrollo de un test de cura para la leishmaniasis visceral válido tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos, es uno de los objetivos de investigación principales identificados por la OMS (Who 2010).

### 5.2.1 Pacientes inmunocompetentes

La protección frente a la infección es dependiente del desarrollo de una inmunidad celular fundamentalmente de tipo Th1, que activa la capacidad leishmanicida de los macrófagos (Kemp 2000, Nylen and Sacks 2007). De hecho, la depresión de la respuesta inmune celular se caracteriza por el fallo de las PBMCs a proliferar frente a antígenos de *Leishmania* (Peruhype-Magalhaes, Martins-Filho et al. 2005, Hailu, Gramiccia et al. 2009). En consecuencia, se necesita una herramienta que permita evaluar la inmunidad celular de manera *ex vivo* sin sensibilizar al paciente.

Por ello, uno de nuestros objetivos ha sido evaluar la utilidad de la proliferación celular y la producción de citoquinas y granzima B como herramienta para conocer la inmunidad celular en pacientes activos y curados de leishmaniasis visceral inmunocompetentes.

- Mediante este estudio hemos podido comprobar que existe una inmunodepresión generalizada de la respuesta celular en los pacientes inmunocompetentes con

leishmaniasis visceral activa que residen en Fuenlabrada. Tras recibir un tratamiento farmacológico efectivo, los pacientes son capaces de generar una inmunidad específica frente al parásito que se caracteriza por la capacidad de sus PBMCs de proliferar frente al antígeno SLA. Además existe una recuperación generalizada de los niveles de las subpoblaciones celulares, deplecionadas durante la enfermedad activa.

Aunque los pacientes con leishmaniasis visceral activa sufren de una funcionalidad de los linfocitos comprometida que no les permite montar una respuesta inmune específica frente al parásito, esta supresión no es completa ya que las PBMCs de los pacientes son capaces de responder tanto proliferando como produciendo citoquinas frente al mitógeno PHA.

- En general entre el 90% y el 95% de los pacientes inmunocompetentes que sufren leishmaniasis visceral presentan una buena respuesta al tratamiento, dándose casos de falta de respuesta al tratamiento, muerte o toxicidad severa entre el 5% al 10% de los pacientes (Murray, Berman et al. 2005, Cruz, Nieto et al. 2006).

En el caso de los pacientes inmunocompetentes que hemos estudiado, solo uno de los catorce sufrió una recaída después de la finalización del tratamiento, lo que representa un 7% de la población. Esta recaída se encuentra asociada con su incapacidad de generar una respuesta inmune celular frente al parásito. El resto de los pacientes inmunocompetentes fueron capaces de desarrollar y mantener una respuesta inmune protectora frente a *Leishmania*, que se mantuvo incluso un año y medio después del episodio de leishmaniasis visceral activa.

- La principal característica utilizada para describir la respuesta de células T es la magnitud, medida generalmente con un único parámetro, pero esto no refleja todo su potencial funcional (Seder, Darrah et al. 2008). En este aspecto el rango de funciones de las células T incluyen su habilidad para proliferar o inducir proliferación en otras células, organizar la repuesta inmune o mediar la secreción de citoquinas. Estas funciones pueden expresarse en unas combinaciones complejas que se han definido como calidad de la respuesta de las células T, que es distinta del fenotipo o la frecuencia de las células T (Seder, Darrah et al. 2008). Esto resulta importante en el caso de los pacientes infectados por el VIH, en los que los niveles de TCD4+ se encuentran bajos. Por todo lo anterior, un pequeño número de células de memoria pueden ser capaces y

suficientes para montar una respuesta inmune secundaria (Moreno, Canavate et al. 2000).

En línea con lo anterior, otro de nuestros objetivos fue comprobar si en pacientes inmunosuprimidos tanto farmacológicamente como debido a la infección por el VIH, aun cuando los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> son bajos, son suficientes para desarrollar una respuesta inmune frente a *Leishmania* tras la cura de LV y mantener esta respuesta en el tiempo.

### **5.2.2 Pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral**

La introducción en la práctica clínica de los medicamentos inmunosupresores ha revolucionado el curso y el tratamiento de distintas enfermedades autoinmunes crónicas. A pesar de su indudable efectividad, su uso se encuentra claramente ligado a un aumento del riesgo de adquirir infecciones causadas por microorganismos oportunistas (Bongartz, Sutton et al. 2006, Winthrop 2006, Dixon, Watson et al. 2007).

En los últimos años, se ha producido un aumento de las condiciones de inmunosupresión no relacionadas con la infección por el VIH y la descripción de casos de leishmaniasis en estos pacientes. Este grupo comprende unas condiciones médicas heterogéneas, que dificultan el control inmunológico de la LV y promueven desde la reactivación de la enfermedad latente hasta el fallo en el control de una nueva infección (van Griensven, Carrillo et al. 2014).

Dado que la defensa del hospedador contra *Leishmania* se encuentra mediada por las células T y las citoquinas secretadas, tales como el IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$ , la alteración de estos mecanismos, por determinadas enfermedades o medicamentos, aumentan la probabilidad de desarrollar leishmaniasis visceral, la cronificación de la infección y una respuesta inadecuada frente al tratamiento (Sacks, Lal et al. 1987, Kemp, Hansen et al. 1992) (Uyemura, Pirmez et al. 1993).

- Tras el estudio de la proliferación celular frente al antígeno SLA y la producción de citoquinas y granzima B en pacientes con LV sometidos a tratamiento inmunosupresor, hemos podido comprobar que la respuesta celular frente al parásito es ausente en la enfermedad activa. Tras la administración de un tratamiento efectivo frente a *Leishmania* se genera una inmunidad celular específica, que puede cuantificarse mediante la anterior aproximación en los pacientes curados.

- Se ha relacionado el uso de antagonistas del TNF- $\alpha$  con un mayor riesgo de desarrollar leishmaniasis visceral (Guedes-Barbosa, Pereira da Costa et al. 2013), respecto a otros tratamientos inmunosupresores. Sin embargo, en nuestra población de estudio este tratamiento es predominante entre los pacientes que permanecen asintomáticos (tabla 2a anexos, página 150). Por el contrario entre los pacientes en tratamiento inmunosupresor que desarrollaron leishmaniasis visceral, nueve de los catorce estaban tratados con esteroides únicamente o en combinación con otro fármaco (tabla 5a anexos, página 153). En este sentido se ha descrito, en el modelo murino de leishmaniasis visceral, que el uso continuado de esteroides induce una menor producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 y TNF- $\alpha$ , además de un incremento significativo de la carga parasitaria en el bazo (Rousseau, Suffia et al. 1998).

Además, en un estudio retrospectivo reciente llevado a cabo en la Comunidad Valenciana, se obtuvieron resultados similares en relación al gran número de casos de leishmaniasis visceral entre los pacientes tratados con esteroides. De los doce pacientes inmunosuprimidos que desarrollaron LV, seis se encontraban bajo este tipo de tratamiento (Ramos, Leon et al. 2017).

Otro medicamento inmunosupresor ampliamente utilizado para el tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunes es el metotrexato, que también se ha asociado con el desarrollo de leishmaniasis visceral. En nuestros pacientes, pudimos ver que el segundo tratamiento más empleado en esta población fue el metotrexato, ya fuese solo o en combinación.

En la literatura actualmente solo hay descritos algunos estudios retrospectivos de casos clínicos y revisiones (Fernandez-Guerrero, Aguado et al. 1987, Fernandez-Guerrero, Robles et al. 2004, Ramos, Leon et al. 2017) sobre pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente que desarrollaron leishmaniasis visceral, siendo todos ellos descripciones clínicas.

Este trabajo supone la primera vez que se caracteriza una amplia cohorte de pacientes inmunosuprimidos (n=14) curados de leishmaniasis visceral que residen en la misma zona endémica. Además, es la primera descripción de la utilidad de la proliferación celular y la producción de IFN- $\gamma$  como marcadores para establecer la cura de la LV en este tipo de pacientes.

- En los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, las recaídas después de un primer episodio de leishmaniasis visceral son menos frecuentes que en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*; sin embargo, estos pacientes continúan teniendo un riesgo mayor de recaída que los sujetos inmunocompetentes (Aronson, Herwaldt et al. 2017). Con el objetivo de evaluar la utilidad de la proliferación celular frente al SLA y la producción específica de IFN- $\gamma$  como predictores de recaída, hemos seguido a lo largo del tiempo a un grupo de pacientes sometidos a inmunosupresión terapéutica.

En los pacientes estudiados en esta tesis doctoral, hemos encontrado dos patrones de respuesta diferente. Por un lado, un grupo de pacientes caracterizados por una inmunidad celular frente a *Leishmania* mantenida, incluso una vez que se ha reintroducido el tratamiento inmunosupresor, que no presentaron recaídas. Por otro lado, dos pacientes perdieron la respuesta inmune específica, lo que se relacionó con la aparición de la enfermedad activa. Estas recaídas ocurrieron más de 12 meses después del episodio de leishmaniasis visceral. Esto pone de manifiesto que en estos pacientes es necesario realizar un seguimiento mucho más estrecho y continuado en el tiempo que el que es necesario llevar a cabo en los pacientes inmunocompetentes curados de leishmaniasis visceral.

Con los resultados obtenidos, y a pesar de la limitación que supone el tamaño de nuestra población, consideramos que el seguimiento de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente mediante la caracterización de la respuesta inmune mediada por células, puede ayudar a confirmar la recuperación después del tratamiento de LV y evaluar el riesgo de recaída.

- Por otro lado, cuando un paciente inmunosuprimido farmacológicamente desarrolla leishmaniasis visceral, siempre que la enfermedad autoinmune lo permita, se le retira el tratamiento inmunosupresor durante el tratamiento de la misma. La pauta de reintroducción del tratamiento inmunosupresor apoyada en el desarrollo de una respuesta celular específica frente a *Leishmania*, ha mostrado ser una herramienta útil para ello. A partir de nuestros datos, el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune frente al parásito, medida mediante la proliferación celular específica y la producción de IFN- $\gamma$  tras la estimulación con el antígeno SLA, es un marcador útil para la reintroducción del medicamento inmunosupresor de manera segura para el paciente.

### 5.2.3. Pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*

Aunque la introducción del TARGA ha provocado una bajada en la incidencia, la LV sigue constituyendo un problema en los pacientes con SIDA, siendo la tercera enfermedad parasitaria oportunista más frecuente en Europa (Desjeux and Alvar 2003).

La disminución en los últimos años de los casos de recaídas y la mortalidad asociada a la coinfección, puede explicarse no solo por las mejores condiciones de los pacientes en tratamiento TARGA sino también, por el aumento de la prescripción de Anfotericina B liposomal para el tratamiento de la leishmaniasis, que presenta menos efectos colaterales que los antimoniales (Gil-Prieto, Walter et al. 2011). A pesar de todo, los casos de coinfección VIH-*Leishmania* continúan caracterizándose por unas menores tasas de cura, mayores tasas de toxicidad asociada a los fármacos y mayores tasas de mortalidad y recaídas en comparación con los pacientes con LV que no presentan coinfección por el virus (Monge-Maillo, Norman et al. 2014).

En estos pacientes en los que la cura parasitológica es difícil de lograr y las recaídas son comunes, se necesita un test de cura que sea poco invasivo y que pueda repetirse sin sensibilizar al paciente (Alvar, Aparicio et al. 2008). Es por ello que otro objetivo que nos planteamos en este trabajo fue evaluar la utilidad la respuesta celular frente al antígeno SLA como marcador para establecer la cura clínica de la LV en pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*.

- Nuestros resultados mostraron que la linfoproliferación específica, y la producción de IFN- $\gamma$  tras la estimulación con el antígeno SLA, son marcadores útiles de la funcionalidad de las células frente al parásito en pacientes VIH+, incluso en aquellos que presentan bajos niveles de linfocitos TCD4+. Dentro del contexto de este trabajo, hemos descrito por primera vez la utilidad de estos ensayos celulares para evaluar efectividad del tratamiento en pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* (Castro, Carrillo et al. 2016), ya que esta respuesta se asocia con la cura terapéutica.

- Como se expuso anteriormente, las recaídas son muy frecuentes en la coinfección VIH-*Leishmania*. Se ha demostrado que si un paciente no recibe TARGA, la probabilidad de recaídas aumenta al 60% entre los 6 y los 9 meses tras el tratamiento y al 90% a los 12 meses (Lopez-Velez 2003). En los pacientes VIH+ en los que no se desarrolla esta respuesta frente al parásito a pesar del tratamiento, es necesario mantener

la profilaxis secundaria para evitar recaídas. Tal y como se comentó anteriormente, el paciente inmunocompetente que tampoco fue capaz de desarrollar una respuesta tipo Th1 frente al parásito sufrió una recaída poco tiempo después. Esto nos hace plantearnos el interrogante de si sería necesario administrar profilaxis secundaria también en los pacientes inmunocompetentes que no desarrollen inmunidad celular o en los que se advierta de la pérdida de la misma.

- Es importante destacar que en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* que presentan una producción específica de IFN- $\gamma$ , que puede ir acompañada o no de una respuesta proliferativa frente al antígeno soluble del parásito, se puede retirar la profilaxis secundaria sin recaídas hasta la fecha (desde un año y cuatro meses hasta más de siete años desde la retirada), incluso cuando estos pacientes presentan niveles de linfocitos TCD4+ por debajo de 200 /mm<sup>3</sup>. Estos pacientes además son capaces de eliminar el parásito en sangre completa ya que la qPCR se mantiene negativa en el tiempo.

- Los métodos diagnósticos utilizados hasta ahora para el seguimiento de estos pacientes tras el tratamiento de la LV, como la serología, la detección de antígeno en orina y el cultivo, no han demostrado ser del todo útiles para predecir recaídas en pacientes VIH+ debido a su baja sensibilidad o al tiempo necesario para obtener los resultados (Alvar, Aparicio et al. 2008). En pacientes VIH+ curados de leishmaniasis visceral únicamente un resultado de qPCR positiva es insuficiente para confirmar una recaída de LV. Aunque un aspirado de medula ósea negativo se ha usado como marcador para predecir la efectividad del tratamiento (Diro, Ritmeijer et al. 2018), es un método muy agresivo que resulta inadecuado para el seguimiento de los pacientes.

Por todo ello, nuestro objetivo fue evaluar tanto el ensayo de proliferación celular frente al antígeno SLA como la producción específica de IFN- $\gamma$  en sobrenadante para realizar el seguimiento de pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*.

- El seguimiento ha demostrado que tras el tratamiento ocho de los diez pacientes presentan una producción específica de IFN- $\gamma$  en sobrenadante, acompañada en siete de ellos de una respuesta proliferativa positiva frente al SLA. Estos resultados apoyan el hecho de que una producción específica de IFN- $\gamma$  indica el desarrollo de una inmunidad celular frente al parásito y puede ser un buen predictor de recaídas en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*.

- En uno de los pacientes sin respuesta celular específica pudimos observar que, incluso con administración de profilaxis secundaria, sufrió varias recaídas. Sin embargo, tras diversos ciclos de tratamiento y seguimiento clínico, este paciente desarrolló una respuesta inmune celular caracterizada por una proliferación celular y la producción específica de IFN- $\gamma$  mantenida en el tiempo, por lo que se pudo retirar la profilaxis secundaria sin recaídas hasta la fecha (más de una año después).

Se ha descrito en pacientes coinfectado VIH-*Leishmania*, casos de pacientes con leishmaniasis visceral activa crónica (LVAC). Estos pacientes mantienen una circulación continua del parásito en la sangre presentando periodos asintomáticos y sintomáticos de manera alterna (Bourgeois, Bastien et al. 2010). El caso de los dos pacientes que no desarrollan una respuesta inmune frente al parásito, podría englobarse dentro de este grupo de pacientes LVAC, ya que la parasitemia se mantiene de manera continua; y es seguramente, el mantenimiento de la profilaxis secundaria lo que les previene del desarrollo de episodios sintomáticos.

- Respecto a la administración de profilaxis secundaria, en los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* se recomienda mantenerla después de un primer episodio de leishmaniasis visceral (Lopez-Velez 2001, Alvar, Aparicio et al. 2008, Who 2010). Sin embargo, se está discutiendo si realmente es necesaria en todos los pacientes, debido a su alta toxicidad y elevado coste. Sería preferible mantener la profilaxis secundaria solo en aquellos pacientes que presenten factores predictores de recaída. Se han establecido algunos factores asociados con el fallo del tratamiento como: la incapacidad del paciente de aumentar el recuento de linfocitos T CD4+, historial previo de recaída y un bajo recuento de linfocitos TCD4+ (Cota, de Sousa et al. 2011).

En el contexto de nuestro estudio, hemos demostrado que es posible retirar la profilaxis secundaria, aun cuando el recuento de los linfocitos se encuentra por debajo de las 200 células/mm<sup>3</sup>, si existe una producción específica de IFN- $\gamma$  frente al antígeno SLA. Hemos encontrado además que no existe correlación entre la respuesta inmune que hemos medido y el recuento de linfocitos TCD4+. Esto pone de manifiesto que tomar decisiones basadas solamente en el recuento de linfocitos TCD4+ para mantener o retirar la profilaxis puede resultar insuficiente. Además, nuestros resultados señalan la importancia de medir no solo el número de linfocitos sino su funcionalidad.

En resumen, a pesar del discreto tamaño muestral de nuestra población, estos resultados pueden resultar de utilidad en la práctica clínica, ayudando al manejo de los casos en estos pacientes, a establecer la cura y facilitando la toma de decisiones sobre la retirada o el mantenimiento de la profilaxis secundaria. Además, al relacionarse la inmunidad generada con la ausencia de recaídas y permitir la retirada de la profilaxis secundaria en estos pacientes, se evita parte de la toxicidad que los fármacos provocan en los pacientes que están recibiendo tratamiento de manera periódica.

En la última guía de manejo de los casos de leishmaniasis publicada por la OMS en 2017, a raíz de nuestros datos, se propone la utilidad de la proliferación específica frente al SLA como una buena herramienta para el seguimiento de los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* que permite la retirada de la profilaxis secundaria cuando los niveles de linfocitos T CD4+ se encuentran por debajo de 200 células/mm<sup>3</sup> (Gradoni L 2017. ).

A lo largo de este apartado, hemos descrito la utilidad de las técnicas para evaluar la respuesta inmune celular tras el tratamiento de la leishmaniasis visceral tanto en pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores como en pacientes infectados por el VIH. Las características de inmunosupresión que presentan este tipo de pacientes, junto con el hecho de vivir en una zona de alta endemicidad para leishmaniasis, hacen que planteemos que sea necesario evaluar la inmunidad que presentan frente al parásito, con el fin de monitorizarlos de manera estrecha y evitar que sufran recaídas de la enfermedad activa. Debido a las características clínicas de estos pacientes, necesitan acudir cada tres meses para realizar el seguimiento de la carga viral en el caso de los pacientes VIH+ o para recibir el medicamento inmunosupresor por lo que estas visitas rutinarias serían un buen momento para evaluar de forma complementaria la inmunidad frente al parásito.

### **5.3 Aportaciones dentro los retos actuales para el control de la leishmaniasis**

En Fuenlabrada, área endémica de *Leishmania infantum*, hemos identificado una proporción importante de sujetos inmunocompetentes e inmunosuprimidos que presentan infección asintomática. El uso de la proliferación de las PBMCs frente al antígeno SLA y/o la producción específica de IFN- $\gamma$  es la característica principal que define a esta población, y su medida supone una buena herramienta para realizar tanto el cribado de la infección asintomática, como el seguimiento de la misma a lo largo del

tiempo. Es importante destacar que ninguno de los individuos asintomáticos inmunocompetentes o inmunodeprimidos con respuesta celular específica mantenida en el tiempo desarrolló leishmaniasis visceral clínica. Además, el análisis de estos parámetros en sujetos inmunocompetentes, previo a la administración de un tratamiento inmunosupresor, puede detectar una infección latente por *Leishmania*, cuyo seguimiento podría evitar de forma temprana su reactivación.

En esta tesis doctoral además hemos demostrado que la respuesta inmune que desarrollan los pacientes tras la cura clínica es similar en pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Esta respuesta se caracteriza por una respuesta linfoproliferativa frente al antígeno soluble de *Leishmania* y una producción específica de IFN- $\gamma$ . Esto corrobora que existe una asociación entre la cura de la LV y un perfil inmune relacionado con el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 tras un tratamiento efectivo.

La leishmaniasis continúa siendo una complicación importante en los pacientes inmunosuprimidos. La mejora de las condiciones de los pacientes infectados por el VIH y el desarrollo de medicamentos cada vez más específicos frente a las enfermedades autoinmunes, han permitido que los casos de coinfección sean cada vez menores en estos pacientes, presenten un mejor pronóstico tras el tratamiento y que una parte de ellos, a pesar de estar expuestos frente al parásito, permanezcan asintomáticos generando una respuesta inmune tipo Th1 específica. En los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente además la medida de esta respuesta celular ha demostrado ser una buena técnica para reintroducir el tratamiento inmunosupresor de manera segura para el paciente.

Aunque es necesario realizar ensayos en poblaciones mayores y en otras zonas endémicas, nuestros resultados plantean de manera preliminar que tanto la proliferación celular como la producción de IFN- $\gamma$  frente al antígeno SLA tienen potencial para ser empleados como test de cura válidos en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, además de como marcadores predictores de recaída, ya que se encuentran asociados con el control inmunológico del parásito, la ausencia de reactivación de la enfermedad y son indicadores de una respuesta terapéutica efectiva frente a *Leishmania*.

Nuestro trabajo confirma que la respuesta linfoproliferativa es una técnica adecuada para el seguimiento tanto de pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos en

un ámbito hospitalario. Esta aproximación también es aplicable a estudios amplios como los de cribado en banco de sangre.

Debido a que los test se realizan *in vitro* a partir de muestras de sangre completa, este tipo de ensayos supone una buena herramienta para medir la respuesta celular del paciente *ex vivo*, de una manera poco invasiva y sin sensibilización, lo que permite que estas pruebas se repitan de manera periódica a lo largo del tiempo permitiendo un seguimiento de los pacientes curados y su uso como marcadores predictores de recaída.

---

## **CONCLUSIONES**

---



## 6. Conclusiones

1. El análisis de la respuesta inmune celular en la población de zonas endémicas para leishmaniasis permite identificar individuos inmunocompetentes asintomáticos que no son detectados por técnicas serológicas o moleculares.
2. De forma importante, esta aproximación también ha permitido identificar la infección asintomática para *Leishmania* en la población inmunodeprimida, infectada por el VIH o con tratamientos inmunosupresores, donde los niveles y función de linfocitos T se encuentran comprometidos.
3. El índice de estimulación celular frente al antígeno SLA es un marcador que permite identificar a todos los individuos asintomáticos para *Leishmania*, tanto inmunocompetentes como VIH+. En el caso de los individuos inmunosuprimidos farmacológicamente, la producción de IFN- $\gamma$  tras la estimulación específica permite resolver la condición de aquellos individuos con índice de estimulación dudoso.
4. La proliferación celular frente al antígeno SLA y la producción de IFN- $\gamma$  ha resultado una herramienta útil en el seguimiento de los individuos asintomáticos. En este estudio hemos confirmado que una respuesta celular específica sostenida a lo largo del tiempo previene el desarrollo de leishmaniasis visceral clínica, lo que ha sido especialmente importante en el caso de los individuos inmunodeprimidos por su mayor riesgo.
5. El análisis de la respuesta celular en los pacientes con leishmaniasis visceral activa ha demostrado la ausencia de linfoproliferación y producción específica de citoquinas tras estimulación con el antígeno SLA. La persistencia de esta situación tras el tratamiento se asoció con su falta de eficacia, lo que plantea la posibilidad de utilizarlos como marcadores de respuesta terapéutica.
6. La conversión de estos parámetros en los pacientes en los que el tratamiento resultó eficaz, indicó el desarrollo de una respuesta celular frente al parásito, lo que junto a la ausencia de recaídas, pone de relevancia la utilidad de este ensayo como marcador de cura.
7. La pérdida, tiempo después del tratamiento, de la respuesta celular frente al parásito en pacientes inmunodeprimidos farmacológicamente, con la consiguiente recaída clínica, apoya la necesidad de realizar el seguimiento de estos pacientes con las herramientas descritas en esta tesis doctoral.

8. Los resultados obtenidos en los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente indican que, la producción específica de IFN- $\gamma$  tras la estimulación de las PBMCs con el antígeno SLA, representa un parámetro que ayuda en la decisión del momento idóneo para reintroducir el tratamiento inmunosupresor, tras la cura de la leishmaniasis visceral.
9. Nuestros resultados de seguimiento de pacientes coinfectados VIH-*Leishmania*, con carga viral controlada, muestran que es posible retirar la profilaxis secundaria sin riesgo en los casos que presentan una respuesta celular específica mantenida frente al parásito.
10. La producción específica de IFN- $\gamma$  tras la estimulación de las PBMCs con el antígeno SLA en pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* apoya la decisión sobre la retirada de la profilaxis secundaria de manera segura para el paciente de forma independiente al número de linfocitos TCD4+.
11. Este trabajo demuestra la utilidad de la linfoproliferación y producción específica de IFN- $\gamma$ , tras estimulación con el antígeno SLA, para establecer la infección asintomática, la cura y el riesgo de recaída en los pacientes inmunodeprimidos, lo que hace recomendable la incorporación de esta aproximación al seguimiento continuado de estos pacientes en áreas endémicas para leishmaniasis.

---

# BIBLIOGRAFÍA

---



## Bibliografía

Abubakar, A., J. A. Ruiz-Postigo, J. Pita, M. Lado, R. Ben-Ismail, D. Argaw and J. Alvar (2014). "Visceral leishmaniasis outbreak in South Sudan 2009-2012: epidemiological assessment and impact of a multisectoral response." PLoS Negl Trop Dis **8**(3): e2720.

Adriaensen, W., S. Abdellati, S. van Henten, Y. Gedamu, E. Diro, F. Vogt, B. Mengesha, E. Adem, L. Kestens and J. van Griensven (2018). "Serum Levels of Soluble CD40 Ligand and Neopterin in HIV Coinfected Asymptomatic and Symptomatic Visceral Leishmaniasis Patients." Front Cell Infect Microbiol **8**: 428.

Adriaensen, W., T. P. C. Dorlo, G. Vanham, L. Kestens, P. M. Kaye and J. van Griensven (2017). "Immunomodulatory Therapy of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients." Front Immunol **8**: 1943.

Afonso, L., V. M. Borges, H. Cruz, F. L. Ribeiro-Gomes, G. A. DosReis, A. N. Dutra, J. Clarencio, C. I. de Oliveira, A. Barral, M. Barral-Netto and C. I. Brodskyn (2008). "Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*." J Leukoc Biol **84**(2): 389-396.

Ahsan, M. M., M. N. Islam, A. H. Mollah, M. A. Hoque, M. A. Hossain, Z. Begum and M. T. Islam (2010). "Evaluation of latex agglutination test (KAtex) for early diagnosis of kala-azar." Mymensingh Med J **19**(3): 335-339.

Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votypka, P. Marty, P. Delaunay and D. Sereno (2016). "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies." PLoS Negl Trop Dis **10**(3): e0004349.

Akuffo, H., C. Costa, J. van Griensven, S. Burza, J. Moreno and M. Herrero (2018). "New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed." PLoS Negl Trop Dis **12**(5): e0006375.

Alexander, J. and F. Brombacher (2012). "T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant?" Front Immunol **3**: 80.

Alexandrino-de-Oliveira, P., J. R. Santos-Oliveira, M. E. Dorval, F. Da-Costa, G. R. Pereira, R. V. da Cunha, A. M. Paniago and A. M. Da-Cruz (2010). "HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **105**(5): 692-697.

Alvar, J. (1994). "Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example." Parasitol Today **10**(4): 160-163.

Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez and J. Moreno (2008). "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years." Clin Microbiol Rev **21**(2): 334-359, table of contents.

- Alvar, J., C. Canavate, B. Gutierrez-Solar, M. Jimenez, F. Laguna, R. Lopez-Velez, R. Molina and J. Moreno (1997). "*Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years." Clin Microbiol Rev **10**(2): 298-319.
- Alvar, J., B. Gutierrez-Solar, I. Pachon, E. Calbacho, M. Ramirez, R. Valles, J. L. Guillen, C. Canavate and C. Amela (1996). "AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem." Clin Dermatol **14**(5): 541-546.
- Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin and M. den Boer (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.
- Ambarus, C. A., T. Noordenbos, M. J. de Hair, P. P. Tak and D. L. Baeten (2012). "Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis." Arthritis Res Ther **14**(2): R74.
- Amprey, J. L., J. S. Im, S. J. Turco, H. W. Murray, P. A. Illarionov, G. S. Besra, S. A. Porcelli and G. F. Spath (2004). "A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan." J Exp Med **200**(7): 895-904.
- Ansari, N. A., R. Kumar, S. Gautam, S. Nylen, O. P. Singh, S. Sundar and D. Sacks (2011). "IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis." J Immunol **186**(7): 3977-3985.
- Anstead, G. M., B. Chandrasekar, W. Zhao, J. Yang, L. E. Perez and P. C. Melby (2001). "Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection." Infect Immun **69**(8): 4709-4718.
- Antinori, S., A. Cascio, C. Parravicini, R. Bianchi and M. Corbellino (2008). "Leishmaniasis among organ transplant recipients." Lancet Infect Dis **8**(3): 191-199.
- Antinori, S., L. Schifanella and M. Corbellino (2012). "Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(2): 109-118.
- Arce, A., A. Estirado, M. Ordobas, S. Sevilla, N. Garcia, L. Moratilla, S. de la Fuente, A. M. Martinez, A. M. Perez, E. Aranguel, A. Iriso, O. Sevillano, J. Bernal and F. Vilas (2013). "Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012." Euro Surveill **18**(30): 20546.
- Aronson, N., B. L. Herwaldt, M. Libman, R. Pearson, R. Lopez-Velez, P. Weina, E. Carvalho, M. Ephros, S. Jeronimo and A. Magill (2017). "Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH)." Am J Trop Med Hyg **96**(1): 24-45.
- Ashford, R. W. (1996). "Leishmaniasis reservoirs and their significance in control." Clin Dermatol **14**(5): 523-532.
- Atri, C., F. Z. Guerfali and D. Laouini (2018). "Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases." Int J Mol Sci **19**(6).

- Badaro, R., L. O. Goncalves, L. L. Gois, Z. P. Maia, C. Benson and M. F. Grassi (2015). "Leishmaniasis as a Manifestation of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) in HIV-Infected Patients: A Literature Review." J Int Assoc Provid AIDS Care **14**(5): 402-407.
- Badaro, R., S. G. Reed, A. Barral, G. Orge and T. C. Jones (1986). "Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses." Am J Trop Med Hyg **35**(1): 72-78.
- Bailey, M. S. and D. N. Lockwood (2007). "Cutaneous leishmaniasis." Clin Dermatol **25**(2): 203-211.
- Ballesteros-Tato, A. and T. D. Randall (2014). "Priming of T follicular helper cells by dendritic cells." Immunol Cell Biol **92**(1): 22-27.
- Basiye, F. L., M. Mbuchi, C. Magiri, G. Kirigi, S. Deborggraeve, G. J. Schoone, A. A. Saad, S. El-Safi, E. Matovu and M. K. Wasunna (2010). "Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya." Trop Med Int Health **15**(7): 806-810.
- Baylis, M. (2017). "Potential impact of climate change on emerging vector-borne and other infections in the UK." Environ Health **16**(Suppl 1): 112.
- Bentwich, Z. (2003). "Concurrent infections that rise the HIV viral load." J HIV Ther **8**(3): 72-75.
- Berenguer, J., J. Cosin, P. Miralles, J. C. Lopez and B. Padilla (2000). "Discontinuation of secondary anti-leishmania prophylaxis in HIV-infected patients who have responded to highly active antiretroviral therapy." AIDS **14**(18): 2946-2948.
- Bern, C., R. Haque, R. Chowdhury, M. Ali, K. M. Kurkjian, L. Vaz, J. Amann, M. A. Wahed, Y. Wagatsuma, R. F. Breiman, J. Williamson, W. E. Secor and J. H. Maguire (2007). "The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village." Am J Trop Med Hyg **76**(5): 909-914.
- Bern, C., J. H. Maguire and J. Alvar (2008). "Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **2**(10): e313.
- Beyer, M., M. R. Mallmann, J. Xue, A. Staratschek-Jox, D. Vorholt, W. Krebs, D. Sommer, J. Sander, C. Mertens, A. Nino-Castro, S. V. Schmidt and J. L. Schultze (2012). "High-resolution transcriptome of human macrophages." PLoS One **7**(9): e45466.
- Bhattarai, N. R., G. Van der Auwera, B. Khanal, S. De Doncker, S. Rijal, M. L. Das, S. Uranw, B. Ostyn, N. Praet, N. Speybroeck, A. Picado, C. Davies, M. Boelaert and J. C. Dujardin (2009). "PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar." Trop Med Int Health **14**(4): 404-411.
- Bongartz, T., A. J. Sutton, M. J. Sweeting, I. Buchan, E. L. Matteson and V. Montori (2006). "Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious

infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials." JAMA **295**(19): 2275-2285.

Bourgeois, N., P. Bastien, J. Reynes, A. Makinson, I. Rouanet and L. Lachaud (2010). "Active chronic visceral leishmaniasis' in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients." HIV Med **11**(10): 670-673.

Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks and D. C. Douek (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." Nat Med **12**(12): 1365-1371.

Burza, S., S. L. Croft and M. Boelaert (2018). "Leishmaniasis." Lancet **392**(10151): 951-970.

Canavate, C., M. Herrero, J. Nieto, I. Cruz, C. Chicharro, P. Aparicio, A. Mulugeta, D. Argaw, A. J. Blackstock, J. Alvar and C. Bern (2011). "Evaluation of two rK39 dipstick tests, direct agglutination test, and indirect fluorescent antibody test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a new epidemic site in highland Ethiopia." Am J Trop Med Hyg **84**(1): 102-106.

Carrasco-Anton, N., F. Lopez-Medrano, M. Fernandez-Ruiz, E. Carrillo, J. Moreno, A. Garcia-Reyne, A. Perez-Ayala, M. L. Rodriguez-Ferrero, C. Lumbreras, R. San-Juan, J. Alvar and J. M. Aguado (2017). "Environmental Factors as Key Determinants for Visceral Leishmaniasis in Solid Organ Transplant Recipients, Madrid, Spain." Emerg Infect Dis **23**(7): 1155-1159.

Carrillo, E., N. Carrasco-Anton, F. Lopez-Medrano, E. Salto, L. Fernandez, J. V. San Martin, J. Alvar, J. M. Aguado and J. Moreno (2015). "Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to *Leishmania*, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients." PLoS Negl Trop Dis **9**(10): e0004179.

Carrillo, E., J. Moreno and I. Cruz (2013). "What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid?" Trends Parasitol **29**(12): 579-580.

Carvalho, F. L., D. L. Aires, Z. F. Segunda, C. M. Azevedo, G. Correa Rda, D. M. de Aquino and J. Caldas Ade (2013). "[The epidemiological profile of HIV-positive individuals and HIV-Leishmaniasis co-infection in a referral center in Sao Luis, Maranhao, Brazil]." Cien Saude Colet **18**(5): 1305-1312.

Casado, J. L., R. Lopez-Velez, V. Pintado, C. Quereda, A. Antela and S. Moreno (2001). "Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **20**(3): 202-205.

Castro, A., E. Carrillo, J. V. San Martin, L. Botana, L. Molina, B. Matia, L. Fernandez, L. Horrillo, A. Ibarra-Meneses, C. Sanchez, J. M. Ruiz-Giardin and J. Moreno (2016). "Lymphoproliferative response after stimulation with soluble *Leishmania* antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients." Acta Trop **164**: 345-351.

- Cecilio, P., B. Perez-Cabezas, N. Santarem, J. Maciel, V. Rodrigues and A. Cordeiro da Silva (2014). "Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite." Front Immunol **5**: 480.
- Chakravarty, J., E. Hasker, S. Kansal, O. P. Singh, P. Malaviya, A. K. Singh, A. Chourasia, T. Singh, M. Sudarshan, A. P. Singh, B. Singh, R. P. Singh, B. Ostyn, M. Fakiola, A. Picado, J. Menten, J. M. Blackwell, M. E. Wilson, D. Sacks, M. Boelaert and S. Sundar (2019). "Determinants for progression from asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A cohort study." PLoS Negl Trop Dis **13**(3): e0007216.
- Chappuis, F., S. Rijal, U. K. Jha, P. Desjeux, B. M. Karki, S. Koirala, L. Loutan and M. Boelaert (2006). "Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal." Trop Med Int Health **11**(1): 31-40.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar and M. Boelaert (2007). "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nat Rev Microbiol **5**(11): 873-882.
- Charmoy, M., R. Megnekou, C. Allenbach, C. Zweifel, C. Perez, K. Monnat, M. Breton, C. Ronet, P. Launois and F. Tacchini-Cottier (2007). "*Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection." J Leukoc Biol **82**(2): 288-299.
- Chen, L. (2004). "Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity." Nat Rev Immunol **4**(5): 336-347.
- Chianura, L. and L. Cirasino (2006). "*Leishmania* infection in a 51-year-old woman with sarcoidosis: case report." APMIS **114**(11): 825-827.
- Christodoulou, V., M. Antoniou, P. Ntais, I. Messaritakis, V. Ivovic, J. P. Dedet, F. Pratlong, V. Dvorak and Y. Tselentis (2012). "Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete." Vector Borne Zoonotic Dis **12**(3): 214-222.
- Collin, S., R. Davidson, K. Ritmeijer, K. Keus, Y. Melaku, S. Kipngetich and C. Davies (2004). "Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan." Clin Infect Dis **38**(5): 612-619.
- Cooper, G. R., C. R. Rein and J. W. Beard (1946). "Electrophoretic analysis of kala-azar human serum; hypergammaglobulinemia associated with seronegative reactions for syphilis." Proc Soc Exp Biol Med **61**: 179-183.
- Cota, G. F., M. R. de Sousa, B. M. de Freitas Nogueira, L. I. Gomes, E. Oliveira, T. S. Assis, A. L. de Mendonca, B. F. Pinto, J. W. Saliba and A. Rabello (2013). "Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study." Am J Trop Med Hyg **89**(3): 570-577.
- Cota, G. F., M. R. de Sousa, A. L. de Mendonca, A. Patrocinio, L. S. Assuncao, S. R. de Faria and A. Rabello (2014). "*Leishmania*-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil." PLoS Negl Trop Dis **8**(4): e2816.

- Cota, G. F., M. R. de Sousa, T. O. Fereguetti and A. Rabello (2013). "Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison." PLoS Negl Trop Dis **7**(5): e2195.
- Cota, G. F., M. R. de Sousa and A. Rabello (2011). "Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1153.
- Cota, G. F., L. I. Gomes, B. F. Pinto, J. R. Santos-Oliveira, A. M. Da-Cruz, M. S. Pedrosa, W. L. Tafuri and A. Rabello (2012). "Dyarrheal Syndrome in a Patient Co-Infected with *Leishmania infantum* and *Schistosoma mansoni*." Case Rep Med **2012**: 240512.
- Cruz, I., C. Canavate, J. M. Rubio, M. A. Morales, C. Chicharro, F. Laguna, M. Jimenez-Mejias, G. Sirera, S. Videla, J. Alvar and H. I. V. L. S. G. Spanish (2002). "A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus." Trans R Soc Trop Med Hyg **96 Suppl 1**: S185-189.
- Cruz, I., A. Millet, E. Carrillo, M. Chenik, P. Salotra, S. Verma, N. Veland, M. Jara, V. Adai, C. Castrillon, J. Arevalo, J. Moreno and C. Canavate (2013). "An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis." Exp Parasitol **134**(3): 281-289.
- Cruz, I., J. Nieto, J. Moreno, C. Canavate, P. Desjeux and J. Alvar (2006). "*Leishmania*/HIV co-infections in the second decade." Indian J Med Res **123**(3): 357-388.
- Cunha, J., E. Carrillo, C. Sanchez, I. Cruz, J. Moreno and A. Cordeiro-da-Silva (2013). "Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis." Parasit Vectors **6**: 122.
- da Matta, V. L., S. Hoshino-Shimizu, R. Dietze and C. E. Corbett (2000). "Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis." J Clin Lab Anal **14**(1): 5-12.
- Das, S., G. Matlashewski, G. S. Bhunia, S. Kesari and P. Das (2014). "Asymptomatic *Leishmania* infections in northern India: a threat for the elimination programme?" Trans R Soc Trop Med Hyg **108**(11): 679-684.
- de la Loma, A., J. Alvar, E. Martinez Galiano, J. Blazquez, A. Alcalá Muñoz and R. Najera (1985). "Leishmaniasis or AIDS?" Trans R Soc Trop Med Hyg **79**(3): 421-422.
- de Oliveira, C. I. and C. I. Brodskyn (2012). "The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection." Front Immunol **3**: 145.
- de Paiva-Cavalcanti, M., R. C. de Morais, E. S. R. Pessoa, L. A. Trajano-Silva, C. Goncalves-de-Albuquerque Sda, H. Tavares Dde, M. C. Brelaz-de-Castro, F. Silva Rde and V. R. Pereira (2015). "Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools." Cell Biosci **5**: 31.
- de Ruiter, C. M., C. van der Veer, M. M. Leeftang, S. Deborggraeve, C. Lucas and E. R. Adams (2014). "Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic

review and meta-analysis of diagnostic test accuracy." J Clin Microbiol **52**(9): 3147-3155.

De Silva, G., V. Somaratne, S. Senaratne, M. Vipuladasa, R. Wickremasinghe, R. Wickremasinghe and S. Ranasinghe (2017). "Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*." PLoS One **12**(11): e0187024.

del Amo J, B. F., Serrano S, Morillo R, Marrugat J, Fernández E, Ed. (2015). VIH en España 2017: Políticas para una nueva gestión de la cronicidad, más allá del control virológico.

del Giudice, P., M. Mary-Krause, C. Pradier, S. Grabar, P. Dellamonica, P. Marty, J. A. Gastaut, D. Costagliola, E. Rosenthal and H. I. V. C. E. G. French Hospital Database on (2002). "Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus." J Infect Dis **186**(9): 1366-1370.

Deniau, M., C. Canavate, F. Faraut-Gambarelli and P. Marty (2003). "The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients." Ann Trop Med Parasitol **97 Suppl 1**: 115-133.

Denton, C. P. and C. M. Black (1999). "Novel therapeutic strategies in scleroderma." Curr Rheumatol Rep **1**(1): 22-27.

Desai, S. and A. Landay (2010). "Early immune senescence in HIV disease." Curr HIV/AIDS Rep **7**(1): 4-10.

Desjeux, P. and J. Alvar (2003). "*Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe." Ann Trop Med Parasitol **97 Suppl 1**: 3-15.

Diaz-Gandarilla, J. A., C. Osorio-Trujillo, V. I. Hernandez-Ramirez and P. Talamas-Rohana (2013). "PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA(2)-COX-2 inhibition, activating ROS production against *Leishmania mexicana*." Biomed Res Int **2013**: 215283.

Diefenbach, A., H. Schindler, N. Donhauser, E. Lorenz, T. Laskay, J. MacMicking, M. Rollinghoff, I. Gresser and C. Bogdan (1998). "Type 1 interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite." Immunity **8**(1): 77-87.

Diro, E., L. Lynen, K. Ritmeijer, M. Boelaert, A. Hailu and J. van Griensven (2014). "Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa." PLoS Negl Trop Dis **8**(6): e2869.

Diro, E., K. Ritmeijer, M. Boelaert, F. Alves, R. Mohammed, C. Abongomera, R. Ravinetto, M. De Crop, H. Fikre, C. Adera, H. van Loen, A. Tsoumanis, W. Adriaensen, A. Hailu and J. V. Griensven (2018). "Long-term Clinical Outcomes in Visceral Leishmaniasis/Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients During and After Pentamidine Secondary Prophylaxis in Ethiopia: A Single-Arm Clinical Trial." Clin Infect Dis **66**(3): 444-451.

Dixon, W. G., K. D. Watson, M. Lunt, K. L. Hyrich, C. British Society for Rheumatology Biologics Register Control Centre, A. J. Silman, D. P. Symmons and R.

- British Society for Rheumatology Biologics (2007). "Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register." Arthritis Rheum **56**(9): 2905-2912.
- Doherty, P. C. (2007). "Challenged by complexity: my twentieth century in immunology." Annu Rev Immunol **25**: 1-19.
- Ehlers, S. (2003). "Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF." Ann Rheum Dis **62 Suppl 2**: ii37-42.
- Elmahallawy, E. K., A. Sampedro Martinez, J. Rodriguez-Granger, Y. Hoyos-Mallecot, A. Agil, J. M. Navarro Mari and J. Gutierrez Fernandez (2014). "Diagnosis of leishmaniasis." J Infect Dev Ctries **8**(8): 961-972.
- Ena, J., F. Pasquau, M. del Mar Lopez-Perezagua, C. Martinez-Peinado and F. Arjona (2014). "Screening for subclinical *Leishmania* infection in HIV-infected patients living in eastern Spain." Pathog Glob Health **108**(8): 356-361.
- Esch, K. J., R. Juelsgaard, P. A. Martinez, D. E. Jones and C. A. Petersen (2013). "Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function." J Immunol **191**(11): 5542-5550.
- Evans, T. G., E. C. Krug, M. E. Wilson, A. W. Vasconcelos, J. E. de Alencar and R. D. Pearson (1989). "Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot." Mem Inst Oswaldo Cruz **84**(2): 157-166.
- Evans, T. G., M. J. Teixeira, I. T. McAuliffe, I. Vasconcelos, A. W. Vasconcelos, A. Sousa Ade, J. W. Lima and R. D. Pearson (1992). "Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil." J Infect Dis **166**(5): 1124-1132.
- Faleiro, R. J., R. Kumar, L. M. Hafner and C. R. Engwerda (2014). "Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **8**(7): e2914.
- Fernandez-Guerrero, M. L., J. M. Aguado, L. Buzon, C. Barros, C. Montalban, T. Martin and E. Bouza (1987). "Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts." Am J Med **83**(6): 1098-1102.
- Fernandez-Guerrero, M. L., P. Robles, P. Rivas, F. Mojer, G. Muniz and M. de Gorgolas (2004). "Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis." Acta Trop **90**(1): 11-16.
- Gadisa, E., E. Custodio, C. Canavate, L. Sordo, Z. Abebe, J. Nieto, C. Chicharro, A. Aseffa, L. Yamuah, H. Engers, J. Moreno and I. Cruz (2012). "Usefulness of the rK39-immunochromatographic test, direct agglutination test, and leishmanin skin test for detecting asymptomatic *Leishmania* infection in children in a new visceral leishmaniasis focus in Amhara State, Ethiopia." Am J Trop Med Hyg **86**(5): 792-798.
- Gallo, P., R. Goncalves and D. M. Mosser (2010). "The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production." Immunol Lett **133**(2): 70-77.

- Galvao-Castro, B., J. A. Sa Ferreira, K. F. Marzochi, M. C. Marzochi, S. G. Coutinho and P. H. Lambert (1984). "Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis." Clin Exp Immunol **56**(1): 58-66.
- Ganguly, S., N. K. Das, J. N. Barbhuiya and M. Chatterjee (2010). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis--an overview." Int J Dermatol **49**(8): 921-931.
- Garcia-Cordoba, F., F. J. Ortuno, M. Segovia and G. Gonzalez Diaz (2005). "Fatal visceral leishmaniasis, with massive bone-marrow infection, in an immunosuppressed but HIV-negative Spanish patient, after the initiation of treatment with meglumine antimoniate." Ann Trop Med Parasitol **99**(2): 125-130.
- Garcia-Gonzalez, E., G. M. Guidelli, M. Bardelli and R. Maggio (2012). "Mucocutaneous leishmaniasis in a patient treated with anti-TNF-alpha therapy." Rheumatology (Oxford) **51**(8): 1517-1518.
- Gautam, A., S. Dixit, M. T. Philipp, S. R. Singh, L. A. Morici, D. Kaushal and V. A. Dennis (2011). "Interleukin-10 alters effector functions of multiple genes induced by *Borrelia burgdorferi* in macrophages to regulate Lyme disease inflammation." Infect Immun **79**(12): 4876-4892.
- Gautam, S., R. Kumar, N. Singh, A. K. Singh, M. Rai, D. Sacks, S. Sundar and S. Nylen (2014). "CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis." J Infect Dis **209**(2): 290-299.
- Ghosh, K., G. Sharma, A. Saha, S. Kar, P. K. Das and A. Ukil (2013). "Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines." J Infect Dis **207**(6): 1016-1025.
- Gidwani, K., S. Jones, R. Kumar, M. Boelaert and S. Sundar (2011). "Interferon-gamma release assay (modified QuantiFERON) as a potential marker of infection for *Leishmania donovani*, a proof of concept study." PLoS Negl Trop Dis **5**(4): e1042.
- Gidwani, K., A. Picado, S. Rijal, S. P. Singh, L. Roy, V. Volfova, E. W. Andersen, S. Uranw, B. Ostyn, M. Sudarshan, J. Chakravarty, P. Volf, S. Sundar, M. Boelaert and M. E. Rogers (2011). "Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial." PLoS Negl Trop Dis **5**(9): e1296.
- Gidwani, K., M. Rai, J. Chakravarty, M. Boelaert and S. Sundar (2009). "Evaluation of leishmanin skin test in Indian visceral leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **80**(4): 566-567.
- Gigley, J. P., R. Bhadra, M. M. Moretto and I. A. Khan (2012). "T cell exhaustion in protozoan disease." Trends Parasitol **28**(9): 377-384.
- Gil-Prieto, R., S. Walter, J. Alvar and A. G. de Miguel (2011). "Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008)." Am J Trop Med Hyg **85**(5): 820-825.
- Gomes, K. W., A. N. Benevides, F. J. Vieira, M. P. Burlamaqui, A. Vieira Mde and L. M. Fontenelle (2012). "Cutaneous leishmaniasis in a patient with ankylosing spondylitis using adalimumab." Rev Bras Reumatol **52**(3): 447-452.

- Gomez-Reino, J. J., L. Carmona, M. Angel Descalzo and G. Biobadaser (2007). "Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection." Arthritis Rheum **57**(5): 756-761.
- Gonzalez-Alba, J. M., M. Rodriguez-Dominguez and M. L. Mateos Lindemann (2011). "[Quantification of HIV-1 viral load]." Enferm Infecc Microbiol Clin **29 Suppl 3**: 47-50.
- Gradoni L, R. L.-V. R., Mokni M. ( 2017. ). "Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region. Regional Office for Europe, Copenhagen; World Health Organization.; 1-62. ."
- Gradoni, L., A. Scalone and M. Gramiccia (1993). "HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections." Trans R Soc Trop Med Hyg **87**(1): 94-96.
- Guedes-Barbosa, L. S., I. Pereira da Costa, V. Fernandes, L. M. Henrique da Mota, I. de Menezes and M. Aaron Scheinberg (2013). "Leishmaniasis during anti-tumor necrosis factor therapy: report of 4 cases and review of the literature (additional 28 cases)." Semin Arthritis Rheum **43**(2): 152-157.
- Guilliams, M., P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad and B. N. Lambrecht (2014). "The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages." Nat Rev Immunol **14**(2): 94-108.
- Gupta, G., S. Oghumu and A. R. Satoskar (2013). "Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis." Adv Appl Microbiol **82**: 155-184.
- Hadjipetrou, A., D. Anyfantakis, A. Gkogkou, K. Palla, E. Lagoudaki, T. Milonaki and S. Kastanakis (2014). "Visceral leishmaniasis in a psoriatic arthritis patient treated with methotrexate." Infez Med **22**(3): 230-235.
- Hadrup, S. R., J. Strindhall, T. Kollgaard, T. Seremet, B. Johansson, G. Pawelec, P. Thor Straten and A. Wikby (2006). "Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly." J Immunol **176**(4): 2645-2653.
- Hagenah, G. C., T. Wundisch, E. Eckstein, S. Zimmermann, F. Holst, W. Grimm, A. Neubauer and M. Lohoff (2007). "[Sepsis-like disease in an immunocompromised patient with a travel history to Mallorca]." Internist (Berl) **48**(7): 727-730.
- Hailu, A., M. Gramiccia and P. A. Kager (2009). "Visceral leishmaniasis in Aba-Roba, south-western Ethiopia: prevalence and incidence of active and subclinical infections." Ann Trop Med Parasitol **103**(8): 659-670.
- Hasker, E., P. Malaviya, K. Gidwani, A. Picado, B. Ostyn, S. Kansal, R. P. Singh, O. P. Singh, A. Chourasia, A. Kumar Singh, R. Shankar, M. E. Wilson, B. Khanal, S. Rijal, M. Boelaert and S. Sundar (2014). "Strong association between serological status and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in prospective cohort studies in India and Nepal." PLoS Negl Trop Dis **8**(1): e2657.

- Hefnawy, A., M. Berg, J. C. Dujardin and G. De Muylder (2017). "Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs." Trends Parasitol **33**(3): 162-174.
- Himmelrich, H., P. Launois, I. Maillard, T. Biedermann, F. Tacchini-Cottier, R. M. Locksley, M. Rocken and J. A. Louis (2000). "In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease." J Immunol **164**(9): 4819-4825.
- Hurissa, Z., S. Gebre-Silassie, W. Hailu, T. Tefera, D. G. Lalloo, L. E. Cuevas and A. Hailu (2010). "Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV co-infection in northwest Ethiopia." Trop Med Int Health **15**(7): 848-855.
- Ibarra-Meneses, A. E. Carrillo., J. Nieto, C. Sánchez, S. Ortega, A. Estirado, P. Latasa Zamalloa, J.C. Sanz, L. García-Comas, M. Ordobás, J. Moreno. ( 2019). "Prevalence of asymptomatic *Leishmania* infection and associated risk factors after an outbreak in the south-west of the Madrid area (Spain)." Eurosurveillance.
- Ibarra-Meneses, A. V., E. Carrillo, C. Sanchez, J. Garcia-Martinez, D. Lopez Lacomba, J. V. San Martin, F. Alves, J. Alvar and J. Moreno (2016). "Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic." Clin Microbiol Infect **22**(8): 739 e731-734.
- Ibarra-Meneses, A. V., P. Ghosh, F. Hossain, R. Chowdhury, D. Mondal, J. Alvar, J. Moreno and E. Carrillo (2017). "IFN-gamma, IL-2, IP-10, and MIG as Biomarkers of Exposure to *Leishmania* spp., and of Cure in Human Visceral Leishmaniasis." Front Cell Infect Microbiol **7**: 200.
- Ibarra-Meneses, A. V., D. Mondal, J. Alvar, J. Moreno and E. Carrillo (2017). "Cytokines and chemokines measured in dried SLA-stimulated whole blood spots for asymptomatic *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* infection." Sci Rep **7**(1): 17266.
- Ishikawa, H., H. Hisaeda, M. Taniguchi, T. Nakayama, T. Sakai, Y. Maekawa, Y. Nakano, M. Zhang, T. Zhang, M. Nishitani, M. Takashima and K. Himeno (2000). "CD4(+)  $\alpha$ 14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*." Int Immunol **12**(9): 1267-1274.
- Italiani, P., E. M. Mazza, D. Lucchesi, I. Cifola, C. Gemelli, A. Grande, C. Battaglia, S. Bicciato and D. Boraschi (2014). "Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro." PLoS One **9**(2): e87680.
- Jaguin, M., N. Houlbert, O. Fardel and V. Lecureur (2013). "Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin." Cell Immunol **281**(1): 51-61.
- Jha, S. N., N. K. Singh and T. K. Jha (1991). "Lymphatic leishmaniasis associated with visceral leishmaniasis." J Assoc Physicians India **39**(9): 716-717.
- Jin, H. T., Y. H. Jeong, H. J. Park and S. J. Ha (2011). "Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment." BMB Rep **44**(4): 217-231.

- Kaech, S. M. and W. Cui (2012). "Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation." Nat Rev Immunol **12**(11): 749-761.
- Kar, K. (1995). "Serodiagnosis of leishmaniasis." Crit Rev Microbiol **21**(2): 123-152.
- Katara, G. K., N. A. Ansari, A. Singh, V. Ramesh and P. Salotra (2012). "Evidence for involvement of Th17 type responses in post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL)." PLoS Negl Trop Dis **6**(6): e1703.
- Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.
- Kemp, K. (2000). "Cytokine-producing T cell subsets in human leishmaniasis." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **48**(3): 173-176.
- Kemp, M., M. B. Hansen and T. G. Theander (1992). "Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from nonexposed individuals." Infect Immun **60**(6): 2246-2251.
- Kenney, R. T., D. L. Sacks, A. A. Gam, H. W. Murray and S. Sundar (1998). "Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment." J Infect Dis **177**(3): 815-818.
- Khalil, E. A., S. A. Khidir, A. M. Musa, B. Y. Musa, M. E. Elfaki, A. M. Elkadaru, E. Zijlstra and A. M. El-Hassan (2013). "Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Paradigm of Paradoxical Immune Reconstitution Syndrome in Non-HIV/AIDS Patients." J Trop Med **2013**: 275253.
- Kohanteb, J. and S. Ardehali (2005). "Cross-reaction of sera from patients with various infectious diseases with *Leishmania infantum*." Med Princ Pract **14**(2): 79-82.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Lawn, S. D., L. Myer, L. G. Bekker and R. Wood (2006). "CD4 cell count recovery among HIV-infected patients with very advanced immunodeficiency commencing antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa." BMC Infect Dis **6**: 59.
- Le Rutte, E. A., L. E. Coffeng, D. M. Bontje, E. C. Hasker, J. A. Postigo, D. Argaw, M. C. Boelaert and S. J. De Vlas (2016). "Feasibility of eliminating visceral leishmaniasis from the Indian subcontinent: explorations with a set of deterministic age-structured transmission models." Parasit Vectors **9**: 24.
- Lieke, T., S. Nylen, L. Eidsmo, C. Schmetz, L. Berg and H. Akuffo (2011). "The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes." Parasitology **138**(14): 1898-1909.
- Liu, D. and J. E. Uzonna (2012). "The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response." Front Cell Infect Microbiol **2**: 83.
- Lopez-Velez, R. (2001). "[Diagnostic assessment in patients with fever syndrome after traveling to the tropics]." Rev Clin Esp **201**(3): 134-136.

- Lopez-Velez, R. (2003). "The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV." Ann Trop Med Parasitol **97 Suppl 1**: 143-147.
- Luz, K. G., R. C. Succi and E. Torres (2001). "[Vitamin A serum level in children with visceral leishmaniasis]." Rev Soc Bras Med Trop **34**(4): 381-384.
- Ma, C. S., E. K. Deenick, M. Batten and S. G. Tangye (2012). "The origins, function, and regulation of T follicular helper cells." J Exp Med **209**(7): 1241-1253.
- Maia, Z., M. Lirio, S. Mistro, C. M. Mendes, S. R. Mehta and R. Badaro (2012). "Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis." PLoS Negl Trop Dis **6**(1): e1484.
- Mariscal, A., M. Carnero-Varo, J. Gomez-Aracena and J. Fernandez-Crehuet (1999). "Development and testing of a microbiological assay to detect residual effects of disinfectant on hard surfaces." Appl Environ Microbiol **65**(8): 3717-3720.
- Martinez, F. O., S. Gordon, M. Locati and A. Mantovani (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression." J Immunol **177**(10): 7303-7311.
- Martins-Melo, F. R., S. Lima Mda, C. H. Alencar, A. N. Ramos, Jr. and J. Heukelbach (2014). "Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000-2011." Trans R Soc Trop Med Hyg **108**(6): 338-347.
- McGwire, B. S. and A. R. Satoskar (2014). "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." QJM **107**(1): 7-14.
- McMahon-Pratt, D. and J. Alexander (2004). "Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?" Immunol Rev **201**: 206-224.
- Medlock, J. M., K. M. Hansford, W. Van Bortel, H. Zeller and B. Alten (2014). "A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of public health importance." J Vector Ecol **39**(1): 72-77.
- Mia, S., A. Warnecke, X. M. Zhang, V. Malmstrom and R. A. Harris (2014). "An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta yields a dominant immunosuppressive phenotype." Scand J Immunol **79**(5): 305-314.
- Michel, G., C. Pomares, B. Ferrua and P. Marty (2011). "Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human." Acta Trop **119**(2-3): 69-75.
- Mikita, K., T. Maeda, S. Yoshikawa, T. Ono, Y. Miyahira and A. Kawana (2014). "The Direct Boil-LAMP method: a simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis." Parasitol Int **63**(6): 785-789.
- Miles, S. A., S. M. Conrad, R. G. Alves, S. M. Jeronimo and D. M. Mosser (2005). "A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*." J Exp Med **201**(5): 747-754.

- Miro, G., R. Checa, A. Montoya, L. Hernandez, D. Dado and R. Galvez (2012). "Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain." Parasit Vectors **5**: 60.
- Molina, R., M. I. Jimenez, I. Cruz, A. Iriso, I. Martin-Martin, O. Sevillano, S. Melero and J. Bernal (2012). "The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain." Vet Parasitol **190**(1-2): 268-271.
- Mollinedo, F., H. Janssen, J. de la Iglesia-Vicente, J. A. Villa-Pulgarin and J. Calafat (2010). "Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils." J Biol Chem **285**(45): 34528-34536.
- Monge-Maillo, B., F. F. Norman, I. Cruz, J. Alvar and R. Lopez-Velez (2014). "Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region." PLoS Negl Trop Dis **8**(8): e3021.
- Moody, A. H. and P. L. Chiodini (2000). "Methods for the detection of blood parasites." Clin Lab Haematol **22**(4): 189-201.
- Moral, L., E. M. Rubio and M. Moya (2002). "A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(2): 129-132.
- Moreno, J., C. Canavate, C. Chamizo, F. Laguna and J. Alvar (2000). "HIV--*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy." Trans R Soc Trop Med Hyg **94**(3): 328-332.
- Mugasa, C. M., S. Deborggraeve, G. J. Schoone, T. Laurent, M. M. Leeflang, R. A. Ekangu, S. El Safi, A. F. Saad, F. L. Basiye, S. De Doncker, G. W. Lubega, P. A. Kager, P. Buscher and H. D. Schallig (2010). "Accordance and concordance of PCR and NASBA followed by oligochromatography for the molecular diagnosis of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania*." Trop Med Int Health **15**(7): 800-805.
- Muller, K., G. van Zandbergen, B. Hansen, H. Laufs, N. Jahnke, W. Solbach and T. Laskay (2001). "Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 73-76.
- Muraille, E., O. Leo and M. Moser (2014). "TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?" Front Immunol **5**: 603.
- Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." Lancet **366**(9496): 1561-1577.
- Nascimento, M. S., V. Carregaro, D. S. Lima-Junior, D. L. Costa, B. Ryffel, M. S. Duthie, A. de Jesus, R. P. de Almeida and J. S. da Silva (2015). "Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against *Leishmania infantum* infection." J Infect Dis **211**(6): 1015-1026.
- Naucke, T. J., B. Menn, D. Massberg and S. Lorentz (2008). "Sandflies and leishmaniasis in Germany." Parasitol Res **103 Suppl 1**: S65-68.

- Nisar, M. K., A. Rafiq and A. J. Ostor (2015). "Biologic therapy for inflammatory arthritis and latent tuberculosis: real world experience from a high prevalence area in the United Kingdom." Clin Rheumatol **34**(12): 2141-2145.
- Novais, F. O., L. P. Carvalho, J. W. Graff, D. P. Beiting, G. Ruthel, D. S. Roos, M. R. Betts, M. H. Goldschmidt, M. E. Wilson, C. I. de Oliveira and P. Scott (2013). "Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis." PLoS Pathog **9**(7): e1003504.
- Novais, F. O., B. T. Nguyen, D. P. Beiting, L. P. Carvalho, N. D. Glennie, S. Passos, E. M. Carvalho and P. Scott (2014). "Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species." J Infect Dis **209**(8): 1288-1296.
- Nylen, S. and D. Sacks (2007). "Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis." Trends Immunol **28**(9): 378-384.
- Okwor, I. and J. Uzonna (2016). "Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **94**(3): 489-493.
- Olivier, M., R. Badaro, F. J. Medrano and J. Moreno (2003). "The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms." Ann Trop Med Parasitol **97 Suppl 1**: 79-98.
- Pace, D. (2014). "Leishmaniasis." J Infect **69 Suppl 1**: S10-18.
- Paliogianni, F., S. S. Ahuja, J. P. Balow, J. E. Balow and D. T. Boumpas (1993). "Novel mechanism for inhibition of human T cells by glucocorticoids. Glucocorticoids inhibit signal transduction through IL-2 receptor." J Immunol **151**(8): 4081-4089.
- Pereira, L. I., M. L. Dorta, A. J. Pereira, R. P. Bastos, M. A. Oliveira, S. A. Pinto, H. Galdino, Jr., W. Mayrink, W. Barcelos, V. P. Toledo, G. M. Lima and F. Ribeiro-Dias (2009). "Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens." Am J Trop Med Hyg **81**(3): 378-383.
- Peruhype-Magalhaes, V., O. A. Martins-Filho, A. Prata, A. Silva Lde, A. Rabello, A. Teixeira-Carvalho, R. M. Figueiredo, S. F. Guimaraes-Carvalho, T. C. Ferrari and R. Correa-Oliveira (2005). "Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome." Scand J Immunol **62**(5): 487-495.
- Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain and D. Sacks (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-974.
- Petter, A., A. Shetty-Lee, G. Kofler, H. P. Huemer and C. Larcher (2001). "Visceral leishmaniasis in an AIDS patient on successful antiretroviral therapy: failure of parasite eradication despite increase in CD4+ T-cell count but low CD8+ T-cell count." Scand J Infect Dis **33**(3): 236-238.
- Pitta, M. G., A. Romano, S. Cabantous, S. Henri, A. Hammad, B. Kouriba, L. Argiro, M. el Kheir, B. Bucheton, C. Mary, S. H. El-Safi and A. Dessein (2009). "IL-17 and IL-

- 22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*." J Clin Invest **119**(8): 2379-2387.
- Pittalis, S., E. Nicastrì, F. Spinazzola, P. Ghirga, M. De Marco, M. G. Paglia and P. Narciso (2006). "*Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid--treated patients." BMC Infect Dis **6**: 177.
- Prajeeth, C. K., S. Haeberlein, H. Sebald, U. Schleicher and C. Bogdan (2011). "*Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity." Infect Immun **79**(7): 2699-2708.
- Prudhomme, J., N. Rahola, C. Toty, C. Cassan, D. Roiz, B. Vergnes, M. Thierry, J. A. Rioux, B. Alten, D. Sereno and A. L. Banuls (2015). "Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France)." Parasit Vectors **8**: 642.
- Ramos, J. M., R. Leon, E. Merino, M. Montero, A. Aljibe, M. Blanes, S. Reus, V. Boix, M. Salavert and J. Portilla (2017). "Is Visceral Leishmaniasis Different in Immunocompromised Patients Without Human Immunodeficiency Virus? A Comparative, Multicenter Retrospective Cohort Analysis." Am J Trop Med Hyg **97**(4): 1127-1133.
- Ready, P. D. (2010). "Leishmaniasis emergence in Europe." Euro Surveill **15**(10): 19505.
- Reesink, H. W. (2005). "European strategies against the parasite transfusion risk." Transfus Clin Biol **12**(1): 1-4.
- Remoli, M. E., M. Jimenez, C. Fortuna, E. Benedetti, A. Marchi, D. Genovese, M. Gramiccia, R. Molina and M. G. Ciufolini (2016). "Phleboviruses detection in *Phlebotomus perniciosus* from a human leishmaniasis focus in South-West Madrid region, Spain." Parasit Vectors **9**: 205.
- Ribeiro-Gomes, F. L., M. C. Moniz-de-Souza, M. S. Alexandre-Moreira, W. B. Dias, M. F. Lopes, M. P. Nunes, G. Lungarella and G. A. DosReis (2007). "Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase." J Immunol **179**(6): 3988-3994.
- Richardus, J. H. (2015). "Chemoprophylaxis: sufficient evidence for starting implementation pilots." Lepr Rev **86**(1): 128-129.
- Richardus, J. H. and L. Oskam (2015). "Protecting people against leprosy: chemoprophylaxis and immunoprophylaxis." Clin Dermatol **33**(1): 19-25.
- Riera, C., R. Fisa, P. Lopez, E. Ribera, J. Carrio, V. Falco, I. Molina, M. Gallego and M. Portus (2004). "Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **23**(12): 899-904.
- Ritmeijer, K., R. ter Horst, S. Chane, E. M. Aderie, T. Piening, S. M. Collin and R. N. Davidson (2011). "Limited effectiveness of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high HIV prevalence." Clin Infect Dis **53**(12): e152-158.

- Roach, D. R., A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe and W. J. Britton (2002). "TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection." J Immunol **168**(9): 4620-4627.
- Roatt, B. M., R. D. Aguiar-Soares, W. Coura-Vital, H. G. Ker, N. Moreira, J. Vitoriano-Souza, R. C. Giunchetti, C. M. Carneiro and A. B. Reis (2014). "Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease." Front Immunol **5**: 272.
- Rodrigues, V., M. Laforge, L. Campillo-Gimenez, C. Soundaramourty, A. Correia-de-Oliveira, R. J. Dinis-Oliveira, A. Ouaiissi, A. Cordeiro-da-Silva, R. Silvestre and J. Estaquier (2014). "Abortive T follicular helper development is associated with a defective humoral response in *Leishmania infantum*-infected macaques." PLoS Pathog **10**(4): e1004096.
- Rousseau, D., I. Suffia, B. Ferrua, P. Philip, Y. Le Fichoux and J. L. Kubar (1998). "Prolonged administration of dexamethasone induces limited reactivation of visceral leishmaniasis in chronically infected BALB/c mice." Eur Cytokine Netw **9**(4): 655-661.
- Russo, R., L. Nigro, G. Panarello and A. Montineri (2003). "Clinical survey of *Leishmania*/HIV co-infection in Catania, Italy: the impact of highly active antiretroviral therapy (HAART)." Ann Trop Med Parasitol **97 Suppl 1**: 149-155.
- Sacks, D. L., S. L. Lal, S. N. Shrivastava, J. Blackwell and F. A. Neva (1987). "An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar." J Immunol **138**(3): 908-913.
- Santos Cda, S., V. Boaventura, C. Ribeiro Cardoso, N. Tavares, M. J. Lordelo, A. Noronha, J. Costa, V. M. Borges, C. I. de Oliveira, J. Van Weyenbergh, A. Barral, M. Barral-Netto and C. I. Brodskyn (2013). "CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis." J Invest Dermatol **133**(6): 1533-1540.
- Sassi, A., H. Louzir, A. Ben Salah, M. Mokni, A. Ben Osman and K. Dellagi (1999). "Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia." Clin Exp Immunol **116**(1): 127-132.
- Satti, I., A. el Hassan, T. A. Khalil el and H. Akuffo (2002). "The effect of repeated leishmanin skin testing on the immune responses to *Leishmania* antigen in healthy volunteers." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(5): 565-567.
- Savoia, D. (2015). "Recent updates and perspectives on leishmaniasis." J Infect Dev Ctries **9**(6): 588-596.
- Schaefer, K. U., J. A. Kurtzhals, G. S. Gachihi, A. S. Muller and P. A. Kager (1995). "A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya." Trans R Soc Trop Med Hyg **89**(5): 471-475.
- Schallig, H., R. V. P. Hu, A. D. Kent, M. van Loenen, S. Menting, A. Picado, Z. Oosterling and I. Cruz (2019). "Evaluation of point of care tests for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Suriname." BMC Infect Dis **19**(1): 25.

- Scharton, T. M. and P. Scott (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice." J Exp Med **178**(2): 567-577.
- Seder, R. A., P. A. Darrah and M. Roederer (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." Nat Rev Immunol **8**(4): 247-258.
- Serrano, S., A. Araujo, B. Apellaniz, S. Bryson, P. Carravilla, I. de la Arada, N. Huarte, E. Rujas, E. F. Pai, J. L. Arrondo, C. Domene, M. A. Jimenez and J. L. Nieva (2014). "Structure and immunogenicity of a peptide vaccine, including the complete HIV-1 gp41 2F5 epitope: implications for antibody recognition mechanism and immunogen design." J Biol Chem **289**(10): 6565-6580.
- Silva-Freitas, M. L., G. F. Cota, T. S. Machado-de-Assis, C. Giacoia-Gripp, A. Rabello, A. M. Da-Cruz and J. R. Santos-Oliveira (2016). "Immune Activation and Bacterial Translocation: A Link between Impaired Immune Recovery and Frequent Visceral Leishmaniasis Relapses in HIV-Infected Patients." PLoS One **11**(12): e0167512.
- Silva, D. A., M. F. Madeira, A. C. Teixeira, C. M. de Souza and F. B. Figueiredo (2011). "Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program." Vet Parasitol **179**(1-3): 257-261.
- Singh, N., R. Kumar, C. Engwerda, D. Sacks, S. Nylen and S. Sundar (2016). "Tumor necrosis factor alpha neutralization has no direct effect on parasite burden, but causes impaired IFN-gamma production by spleen cells from human visceral leishmaniasis patients." Cytokine **85**: 184-190.
- Singh, O. P., E. Hasker, D. Sacks, M. Boelaert and S. Sundar (2014). "Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control." Clin Infect Dis **58**(10): 1424-1429.
- Singh, O. P., B. Singh, J. Chakravarty and S. Sundar (2016). "Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective." Infect Dis Poverty **5**: 19.
- Singh, O. P., C. B. Stober, A. K. Singh, J. M. Blackwell and S. Sundar (2012). "Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **6**(10): e1874.
- Singh, O. P. and S. Sundar (2014). "Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises." Immunobiology **219**(4): 323-328.
- Soong, L., C. A. Henard and P. C. Melby (2012). "Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis." Semin Immunopathol **34**(6): 735-751.
- Srivastava, P., K. Gidwani, A. Picado, G. Van der Auwera, P. Tiwary, B. Ostyn, J. C. Dujardin, M. Boelaert and S. Sundar (2013). "Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India." Trop Med Int Health **18**(5): 548-554.
- Srividya, G., A. Kulshrestha, R. Singh and P. Salotra (2012). "Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade." Parasitol Res **110**(3): 1065-1078.

- Stanley, A. C. and C. R. Engwerda (2007). "Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis." Immunol Cell Biol **85**(2): 138-147.
- Stauch, A., R. R. Sarkar, A. Picado, B. Ostyn, S. Sundar, S. Rijal, M. Boelaert, J. C. Dujardin and H. P. Duerr (2011). "Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control." PLoS Negl Trop Dis **5**(11): e1405.
- Stein, R., K. Green, K. Bell, C. A. Toledo, G. Uhl, A. Moore, G. A. Shelley and F. P. Hardnett (2011). "Provision of HIV counseling and testing services at five community-based organizations among young men of color who have sex with men." AIDS Behav **15**(4): 743-750.
- Suarez, M., B. M. Valencia, M. Jara, M. Alba, A. K. Boggild, J. C. Dujardin, A. Llanos-Cuentas, J. Arevalo and V. Adai (2015). "Quantification of *Leishmania (Viannia)* Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load." PLoS Negl Trop Dis **9**(7): e0003936.
- Suarez Rodriguez, B., B. Isidoro Fernandez, S. Santos Sanz, M. J. Sierra Moros, R. Molina Moreno, J. Astray Mochales and C. Amela Heras (2012). "[Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]." Rev Esp Salud Publica **86**(6): 555-564.
- Sundar, S., S. Agrawal, K. Pai, M. Chance and M. Hommel (2005). "Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test." Am J Trop Med Hyg **73**(2): 269-271.
- Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, S. K. Bhattacharya and M. Rai (2006). "Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **100 Suppl 1**: S26-33.
- Sundar, S. and M. Rai (2002). "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis." Clin Diagn Lab Immunol **9**(5): 951-958.
- ter Horst, R., S. M. Collin, K. Ritmeijer, A. Bogale and R. N. Davidson (2008). "Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome." Clin Infect Dis **46**(11): 1702-1709.
- Tesmer, L. A., S. K. Lundy, S. Sarkar and D. A. Fox (2008). "Th17 cells in human disease." Immunol Rev **223**: 87-113.
- Thalhofer, C. J., Y. Chen, B. Sudan, L. Love-Homan and M. E. Wilson (2011). "Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*." Infect Immun **79**(1): 108-117.
- Toqeer, M., N. Rahman, M. W. Whitehead and D. Lockwood (2012). "Visceral leishmaniasis in immunosuppressed Caucasian patient." BMJ Case Rep **2012**.
- Travi, B. L., A. Cordeiro-da-Silva, F. Dantas-Torres and G. Miro (2018). "Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us." PLoS Negl Trop Dis **12**(1): e0006082.
- Tuon, F. F., V. A. Neto and V. S. Amato (2008). "*Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian." FEMS Immunol Med Microbiol **54**(2): 158-166.

- Uyemura, K., C. Pirmez, P. A. Sieling, K. Kiene, M. Paes-Oliveira and R. L. Modlin (1993). "CD4+ type 1 and CD8+ type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct T cell receptor repertoires." J Immunol **151**(12): 7095-7104.
- Vallur, A. C., M. S. Duthie, C. Reinhart, Y. Tutterrow, S. Hamano, K. R. Bhaskar, R. N. Coler, D. Mondal and S. G. Reed (2014). "Biomarkers for intracellular pathogens: establishing tools as vaccine and therapeutic endpoints for visceral leishmaniasis." Clin Microbiol Infect **20**(6): O374-383.
- van Griensven, J., E. Carrillo, R. Lopez-Velez, L. Lynen and J. Moreno (2014). "Leishmaniasis in immunosuppressed individuals." Clin Microbiol Infect **20**(4): 286-299.
- Van Weyenbergh, J., G. Santana, A. D'Oliveira, Jr., A. F. Santos, Jr., C. H. Costa, E. M. Carvalho, A. Barral and M. Barral-Netto (2004). "Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: an ex vivo and in vitro study." BMC Infect Dis **4**: 50.
- van Zandbergen, G., M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach and T. Laskay (2004). "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages." J Immunol **173**(11): 6521-6525.
- Varani, S., R. Cagarelli, F. Melchionda, L. Attard, C. Salvadori, A. C. Finarelli, G. A. Gentilomi, R. Tigani, R. Rangoni, R. Todeschini, A. Scalone, T. Di Muccio, M. Gramiccia, L. Gradoni, P. Viale and M. P. Landini (2013). "Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013." Euro Surveill **18**(29): 20530.
- Venzelos, I., Z. Tatsiou, T. G. Papatomas and A. Orazi (2009). "Visceral leishmaniasis in a rheumatoid arthritis patient treated with methotrexate." Int J Infect Dis **13**(4): e169-172.
- Verma, N., D. Singh, K. Pandey, V. N. Das, C. S. Lal, R. B. Verma, P. K. Sinha and P. Das (2013). "Comparative evaluation of PCR and imprint smear microscopy analyses of skin biopsy specimens in diagnosis of macular, papular, and mixed papulo-nodular lesions of post-kala-azar dermal leishmaniasis." J Clin Microbiol **51**(12): 4217-4219.
- Vogel, D. Y., J. E. Glim, A. W. Stavenuiter, M. Breur, P. Heijnen, S. Amor, C. D. Dijkstra and R. H. Beelen (2014). "Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared." Immunobiology **219**(9): 695-703.
- Weigle, K. A., L. A. Labrada, C. Lozano, C. Santrich and D. C. Barker (2002). "PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*." J Clin Microbiol **40**(2): 601-606.
- Weisser, M., B. Khanlari, L. Terracciano, C. Arber, A. Gratwohl, S. Bassetti, C. Hatz, M. Battegay and U. Fluckiger (2007). "Visceral leishmaniasis: a threat to immunocompromised patients in non-endemic areas?" Clin Microbiol Infect **13**(8): 751-753.
- Werneck, G. L., L. Rodrigues, M. V. Santos, I. B. Araujo, L. S. Moura, S. S. Lima, R. B. Gomes, J. H. Maguire and C. H. Costa (2002). "The burden of *Leishmania chagasi*

- infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil." Acta Trop **83**(1): 13-18.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." Nat Immunol **12**(6): 492-499.
- Who (2010). "Control of the leishmaniases. World Health Organ Tech Rep Ser, XII-XIII, 1-186, back cover, XII-XIII, 1-186, back cover. ."
- WHO (2017). Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. Weekly epidemiological record. D. J. Postigo, WHO. **38**: 557–565.
- Winthrop, K. L. (2006). "Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor." Nat Clin Pract Rheumatol **2**(11): 602-610.
- Woelbing, F., S. L. Kostka, K. Moelle, Y. Belkaid, C. Sunderkoetter, S. Verbeek, A. Waisman, A. P. Nigg, J. Knop, M. C. Udey and E. von Stebut (2006). "Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity." J Exp Med **203**(1): 177-188.
- Yi, J. S., M. A. Cox and A. J. Zajac (2010). "T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion." Immunology **129**(4): 474-481.
- Zamora-Chimal, J., J. Hernandez-Ruiz and I. Becker (2017). "NKT cells in leishmaniasis." Immunobiology **222**(4): 641-646.
- Zanger, P., I. Kotter, P. G. Kremsner and S. Gabrysch (2012). "Tumor necrosis factor alpha antagonist drugs and leishmaniasis in Europe." Clin Microbiol Infect **18**(7): 670-676.
- Zijlstra, E. E. and A. M. el-Hassan (2001). "Leishmaniasis in Sudan. Post kala-azar dermal leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **95 Suppl 1**: S59-76.
- Zijlstra, E. E., A. M. el-Hassan, A. Ismael and H. W. Ghalib (1994). "Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **51**(6): 826-836.



---

# ANEXOS

---



## Anexos

	Edad	Sexo	Toma de muestra
<b>C IC 1</b>	42	H	2015
<b>C IC 2</b>	57	M	2015
<b>C IC 3</b>	55	H	2015
<b>C IC 4</b>	60	H	2015
<b>C IC 5</b>	44	M	2015
<b>C IC 6</b>	37	M	2015
<b>C IC 7</b>	45	H	2015
<b>C IC 8</b>	52	H	2015
<b>C IC 9</b>	37	M	2015
<b>C IC 10</b>	34	M	2015
<b>C IC 11</b>	50	H	2015
<b>C IC 12</b>	57	H	2015
<b>C IC 13</b>	24	H	2015
<b>C IC 14</b>	43	H	2015
<b>C IC 15</b>	27	M	2015

	Edad	Sexo	Toma de muestra
<b>C IC 16</b>	37	H	2015
<b>C IC 17</b>	53	H	2015
<b>C IC 18</b>	39	H	2015
<b>C IC 19</b>	59	M	2015
<b>C IC 20</b>	40	H	2015
<b>C IC 21</b>	39	H	2015
<b>C IC 22</b>	43	H	2015
<b>C IC 23</b>	44	H	2015
<b>C IC 24</b>	41	M	2016
<b>C IC 25</b>	31	H	2016
<b>C IC 26</b>	31	M	2012
<b>C IC 27</b>	42	M	2012
<b>C IC 28</b>	28	H	2012
<b>C IC 29</b>	39	M	2012
<b>C IC 30</b>	19	M	2012

	Edad	Sexo	Toma de muestra
<b>C IC 31</b>	51	M	2015
<b>C IC 32</b>	53	H	2015
<b>C IC 33</b>	31	H	2015
<b>C IC 34</b>	22	H	2015
<b>C IC 35</b>	40	H	2015
<b>C IC 36</b>	50	H	2015
<b>C IC 37</b>	37	H	2015
<b>C IC 38</b>	29	H	2015
<b>C IC 39</b>	28	H	2015
<b>C IC 40</b>	31	H	2015
<b>C IC 41</b>	18	H	2015
<b>C IC 42</b>	48	H	2015
<b>C IC 43</b>	28	H	2015
<b>C IC 44</b>	64	H	2015
<b>C IC 45</b>	61	M	2015

	Edad	Sexo	Toma de muestra
<b>C IC 46</b>	46	H	2015
<b>C IC 47</b>	26	M	2015
<b>C IC 48</b>	57	H	2015
<b>C IC 49</b>	33	H	2015
<b>C IC 50</b>	38	H	2015
<b>C IC 51</b>	35	M	2015
<b>C IC 52</b>	49	H	2015
<b>C IC 53</b>	59	H	2015
<b>C IC 54</b>	44	H	2015
<b>C IC 55</b>	52	H	2015
<b>C IC 56</b>	59	M	2015
<b>C IC 57</b>	39	H	2015
<b>C IC 58</b>	48	H	2015
<b>C IC 59</b>	27	H	2015
<b>C IC 60</b>	43	H	2015

Tabla 1a. Características individuales de cada uno de los individuos inmunocompetentes controles (C IC). H: hombre; M: mujer.

	Edad	Sexo	País de origen	Toma de muestra	Enfermedad autoinmune	Tipo tratamiento inmunosupresor
<b>C ISF 1</b>	33	H	España	2013	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 2</b>	57	M	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 3</b>	53	M	Chile	2013	Artritis reumatoide	Unión receptor+ síntesis pirimidina
<b>C ISF 4</b>	45	M	España	2013	Artritis reumatoide	Neutralizador TNF- $\alpha$ + antagonista ac. Fólico
<b>C ISF 5</b>	32	H	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 6</b>	34	M	España	2014	Colitis ulcerosa	Unión receptor
<b>C ISF 7</b>	49	M	España	2013	Crohn	Unión receptor
<b>C ISF 8</b>	51	H	España	2015	Psoriasis	Unión receptor+ antagonista ac. Fólico
<b>C ISF 9</b>	44	M	España	2015	Artritis reumatoide	Antagonista ac.Fólico
<b>C ISF 10</b>	47	H	España	2014	Artritis reumatoide	Neutralizador TNF- $\alpha$ + antagonista ac. Fólico
<b>C ISF 11</b>	56	H	España	2014	Artritis psoriásica	Antagonista ac.Fólico
<b>C ISF 12</b>	51	M	España	2014	Artritis reumatoide	Antagonista ac.Fólico
<b>C ISF 13</b>	54	H	España	2014	Colitis ulcerosa	Neutralizador TNF- $\alpha$
<b>C ISF 14</b>	35	H	España	2014	Artritis reumatoide	Neutralizador TNF- $\alpha$ + síntesis pirimidina
<b>C ISF 15</b>	60	M	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 16</b>	56	M	España	2014	Artritis	Neutralizador TNF- $\alpha$
<b>C ISF 17</b>	35	H	España	2014	Psoriasis	Unión receptor+ antagonista ac. Fólico
<b>C ISF 18</b>	36	H	Rumanía	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 19</b>	55	M	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 20</b>	53	M	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 21</b>	43	M	España	2014	Artritis reumatoide	
<b>C ISF 22</b>	67	M	España	2014	Artritis reumatoide	Unión receptor
<b>C ISF 23</b>	29	H	España	2015	Sacroileítis	Unión receptor
<b>C ISF 24</b>	18	M	España	2014	Psoriasis	Unión receptor
<b>C ISF 25</b>	40	M	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 26</b>	69	M	España	2015	Artritis psoriásica	
<b>C ISF 27</b>	44	H	España	2015	Sacroileítis	Unión receptor
<b>C ISF 28</b>	56	M	España	2015	Artritis reumatoide	Neutralizador TNF- $\alpha$ + glucocorticoide

	Edad	Sexo	País de origen	Toma de muestra	Enfermedad autoinmune	Tipo tratamiento inmunosupresor
<b>C ISF 29</b>	53	H	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 30</b>	54	M	España	2014	Artritis psoriásica	Unión receptor
<b>C ISF 31</b>	58	H	España	2014	Artritis psoriásica	Unión receptor
<b>C ISF 32</b>	50	H	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 33</b>	59	H	España	2014	Psoriasis	Neutralizador TNF- $\alpha$ + antagonista ac. Fólico
<b>C ISF 34</b>	37	M	España	2014	Colitis ulcerosa	Unión receptor
<b>C ISF 35</b>	27	H	España	2015	Sacroileítis	Unión receptor
<b>C ISF 36</b>	59	M	España	2014	Colitis ulcerosa	Unión receptor
<b>C ISF 37</b>	66	H	España	2014	Artritis psoriásica	Neutralizador TNF- $\alpha$
<b>C ISF 38</b>	29	H	España	2014	Espondilitis	Neutralizador TNF- $\alpha$
<b>C ISF 39</b>	83	H	España	2014	Artritis reumatoide	Unión receptor
<b>C ISF 40</b>	51	M	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 41</b>	34	H	España	2014	Crohn	Neutralizador TNF- $\alpha$ + antagonista purina
<b>C ISF 42</b>	48	H	España	2014	Psoriasis	Unión receptor
<b>C ISF 43</b>	42	M	España	2014	Espondilitis	Neutralizador TNF- $\alpha$
<b>C ISF 44</b>	64	H	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 45</b>	49	M	España	2014	Artritis psoriásica	Unión receptor
<b>C ISF 46</b>	71	M	España	2014	Artritis reumatoide	Unión receptor
<b>C ISF 47</b>	59	M	España	2014	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 48</b>	49	M	España	2014	Artritis psoriásica	Unión receptor
<b>C ISF 49</b>	60	H	España	2014	Espondilitis	Corticoide+ antagonista ac.Fólico
<b>C ISF 50</b>	64	H	España	2013	Espondilitis	Unión receptor
<b>C ISF 51</b>	50	H	España	2013	Psoriasis	Unión receptor+ antagonista ac. Fólico
<b>C ISF 52</b>	41	M	España	2015	Crohn	Unión receptor + antagonista purina
<b>C ISF 53</b>	35	H	España	2015	Espondilitis anquilosante	Unión receptor
<b>C ISF 54</b>	50	H	España	2014	Artritis reumatoide	Neutralizador TNF- $\alpha$ + antagonista ac. Fólico+corticoide
<b>C ISF 55</b>	23	M	España	2015	Crohn	Unión receptor

Tabla 2a. Características individuales de cada uno de los individuos inmunosuprimidos farmacológicamente controles (C ISF) con respecto a la edad, sexo, país de origen, año de la toma de muestra, tipo de enfermedad autoinmune y tratamiento inmunosupresor. H: hombre; M: mujer.

	Edad	Sexo	País de origen	Toma de muestra	Vía adquisición VIH	TARGA
<b>C VIH 1</b>	48	H	España	2014	UDI	Adherencia
<b>C VIH 2</b>	44	H	África	2016	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 3</b>	37	H	Perú	2015	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 4</b>	37	M	África	2015	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 5</b>	56	H	España	2014	Desconocido	Adherencia
<b>C VIH 6</b>	56	M	España	2015	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 7</b>	38	H	España	2014	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 8</b>	68	H	España	2014	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 9</b>	49	H	África	2014	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 10</b>	48	M	España	2014	UDI	Adherencia
<b>C VIH 11</b>	51	H	España	2016	UDI	Adherencia
<b>C VIH 12</b>	54	M	África	2013	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 13</b>	51	H	España	2014	UDI	Adherencia
<b>C VIH 14</b>	46	M	España	2016	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 15</b>	34	H	España	2014	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 16</b>	31	H	Ucrania	2014	UDI	Adherencia
<b>C VIH 17</b>	54	H	España	2014	UDI	Adherencia
<b>C VIH 18</b>	54	H	España	2014	UDI	Adherencia
<b>C VIH 19</b>	36	M	África	2014	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 20</b>	43	H	España	2014	Homosexual	Adherencia

	Edad	Sexo	País de origen	Toma de muestra	Vía adquisición VIH	TARGA
<b>C VIH 21</b>	22	H	España	2014	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 22</b>	51	M	España	2014	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 23</b>	51	H	España	2015	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 24</b>	30	H	España	2015	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 25</b>	42	H	España	2015	UDI	Adherencia
<b>C VIH 26</b>	44	M	África	2014	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 27</b>	29	H	España	2015	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 28</b>	54	H	España	2015	UDI	Adherencia
<b>C VIH 29</b>	49	H	España	2015	UDI	Adherencia
<b>C VIH 30</b>	42	H	España	2015	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 31</b>	44	M	España	2015	UDI	Adherencia
<b>C VIH 32</b>	56	H	España	2014	UDI	Adherencia
<b>C VIH 33</b>	47	H	España	2015	UDI	Adherencia
<b>C VIH 34</b>	40	H	África	2014	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 35</b>	40	H	España	2015	Sexual	Adherencia
<b>C VIH 36</b>	51	M	África	2015	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 37</b>	22	H	España	2015	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 38</b>	40	M	África	2014	Heterosexual	Adherencia
<b>C VIH 39</b>	33	M	África	2015	Homosexual	Adherencia
<b>C VIH 40</b>	52	H	España	2015	UDI	Adherencia

Tabla 3a. Características individuales de cada uno de los individuos VIH+ controles (C VIH) con respecto a la edad, sexo, país de origen, año de la toma de muestra y la vía de adquisición del VIH. H: hombre; M: mujer. TARGA: tratamiento antirretroviral de gran actividad. UDI: usuario de drogas intravenosas.

	Edad	Sexo	País de origen	Año primer episodio LV	Tratamiento Leishmania	Recaída
<b>Pac IC 1</b>	52	H	España	2013	L-AmB 32 mg/kg	NO
<b>Pac IC 2</b>	60	H	España	2013	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 3</b>	49	M	Guinea Ecuatorial	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 4</b>	41	H	Guinea Ecuatorial	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 5</b>	38	M	Guinea Ecuatorial	2015	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 6</b>	34	M	Guinea Ecuatorial	2015	L-AmB 21 mg/kg	SI
<b>Pac IC 7</b>	22	M	Guinea Ecuatorial	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 8</b>	34	H	Guinea Ecuatorial	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 9</b>	36	H	Nigeria	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 10</b>	37	H	Nigeria	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 11</b>	64	H	Guinea Ecuatorial	2015	AmB complejo lipídico 20 mg/kg	NO
<b>Pac IC 12</b>	41	H	China	2014	--	NO
<b>Pac IC 13</b>	47	M	China	2015	--	NO
<b>Pac IC 14</b>	46	M	Guinea Ecuatorial	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 15</b>	38	H	Nigeria	2014	L-AmB 21 mg/kg	NO
<b>Pac IC 16</b>	45	H	España	2012	L-AmB 21 mg/kg	NO

Tabla 4a. Características individuales de cada uno de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral con respecto a la edad, sexo, país de origen, año de la enfermedad activa y el tratamiento. H: hombre; M: mujer. LV: leishmaniasis visceral. L-AmB: anfotericina B liposomal en dosis miligramo/kilogramo de peso. AmB: anfotericina B

	Edad	Sexo	País de origen	Enfermedad autoinmune	Tipo tto IS antes	Tto IS durante Leishmaniasis	Tiempo reintroducción inmunosupresor	Tipo tto IS después	Año primer episodio LV	Tratamiento Leishmaniasis	Recaída
<b>Pac 1 ISF</b>	60	M	España	Artritis reumatoide	IL20+ antagonista ac.fólico	NO	4 meses	Glucocorticoide + antagonista ac.fólico	2014	L-AmB 40 mg/kg	NO
<b>Pac 2 ISF</b>	65	H	España	No especificada	Esteroides	NO	8 meses	Esteroides	2013	L-AmB 30 mg/kg	SI
<b>Pac 3 ISF</b>	72	H	España	Aortitis	Esteroides	Esteroides	Nunca se retiraron	Esteroides	2014	L-AmB 36 mg/kg	NO
<b>Pac 4 ISF</b>	44	M	España	Psoriasis	Antagonista ac. Fólico	NO	0,5 meses	Antagonista ac. Fólico	2014	L-AmB 40 mg/kg	NO
<b>Pac 5 ISF</b>	45	M	España	Psoriasis	Esteroides + unión al receptor TNF	NO	5 meses	Unión al receptor TNF	2013	L-AmB 21mg/kg	NO
<b>Pac 6 ISF</b>	54	H	España	Sacroileítis	Unión al receptor+ glucocorticoide+ antagonista ác. Fólico	NO	Antes de fin tto Leishmania	Unión al receptor+ glucocorticoide+ antagonista ác. Fólico	2013	L-AmB 40 mg/kg	NO
<b>Pac 7 ISF</b>	55	M	España	Artritis reumatoide	Esteroides + antagonista ac. Fólico	NO	Antes de fin tto Leishmania	Esteroides	2012	L-AmB 21mg/kg	SI
<b>Pac 8 ISF</b>	47	M	España	Crohn	Unión al receptor TNF	NO	2 meses	Unión al receptor TNF	2014	L-AmB 24mg/kg	NO
<b>Pac 9 ISF</b>	93	H	España	No especificada	Esteroides	NO			2011	L-AmB 30 mg/kg	NO
<b>Pac 10 ISF</b>	66	H	España	Artritis reumatoide	Antagonista ac. Fólico	NO	2,5 meses	Esteroides	2011	L-AmB 40 mg/kg	NO
<b>Pac 11 ISF</b>	52	H	España	Colitis ulcerosa	Esteroides	NO	Antes de fin tto Leishmania	Esteroides	2011	L-AmB 40 mg/kg	NO
<b>Pac 12 ISF</b>	70	M	España	No especificada	Esteroides + antagonista ac. Fólico	NO	0,5 meses	Esteroides + antagonista ac. Fólico	2010	L-AmB 30 mg/kg	NO
<b>Pac 13 ISF</b>	45	H	España	Neumonía intersticial	Esteroides	Esteroides	Nunca se retiraron	Esteroides	2012	L-AmB 40 mg/kg	NO
<b>Pac 14 ISF</b>	71	H	Cuba	Artritis reumatoide	Esteroides + antagonista ac. Fólico	NO	4 meses	Esteroides + antagonista ac. Fólico	2012	L-AmB 40 mg/kg	NO

Tabla 5a. Características individuales de cada uno de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) con leishmaniasis visceral con respecto a la edad, sexo, país de origen tipo de enfermedad autoinmune, tipo de tratamiento inmunosupresor (tto IS), fecha de reintroducción del inmunosupresor, año de la enfermedad activa y el tratamiento. H: hombre; M: mujer. LV: leishmaniasis visceral. MTX: metotrexato. L-AmB: anfotericina B liposomal en dosis miligramo/kilogramo de peso.

	Edad	Sexo	País de origen	Vía adquisición VIH	Adherencia TARGA	Estatus basal	Año primer episodio LV	Tratamiento Leishmaniasis	Profilaxis secundaria	Recaida
<b>Pac VIH 1</b>	41	H	Polonia	HSH	SI	Sin profilaxis	2012	L-AmB 40mg/kg	L-AmB	NO
<b>Pac VIH 2</b>	46	M	Guinea Ecuatorial	Hetero	SI	Sin profilaxis	2012	L-AmB 40mg/kg	L-AmB	NO
<b>Pac VIH 3</b>	51	H	España	Hetero	SI	Sin profilaxis	2013	L-AmB 22mg/kg	Antimoniales	NO
<b>Pac VIH 4</b>	37	H	Nigeria	Hetero	SI	En profilaxis	2012	L-AmB 40mg/kg	L-AmB	NO
<b>Pac VIH 5</b>	61	H	España	HSH	SI	En profilaxis	2013	L-AmB 39mg/kg	L-AmB	NO
<b>Pac VIH 6</b>	22	M	Guinea Ecuatorial	Vertical	SI	En profilaxis	2012	L-AmB 21mg/kg	L-AmB	NO
<b>Pac VIH 7</b>	48	H	España	UDI	SI	En profilaxis	2012	L-AmB 31mg/kg	Antimoniales	NO
<b>Pac VIH 8</b>	48	H	España	UDI	SI	En profilaxis	2013	L-AmB 30mg/kg	Antimoniales	SI
<b>Pac VIH 9</b>	39	H	Peru	Hetero	SI	En profilaxis	2012	L-AmB 30mg/kg	L-AmB	NO
<b>Pac VIH 10</b>	38	H	Nigeria	Hetero	NO	LV activa	2013	L-AmB 32mg/kg	L-AmB	NO

Tabla 6a. Características individuales de cada uno de los pacientes coinfectados VIH-*Leishmania* con respecto a la edad, sexo, país de origen, vía de adquisición del VIH, año de la enfermedad activa, el tratamiento y la profilaxis secundaria. H: hombre; M: mujer. HSH: hombre que tiene sexo con hombre; Hetero: heterosexual; UDI: usuario de drogas intravenosas. LV: leishmaniasis visceral. L-AmB: anfotericina B liposomal en dosis miligramo/kilogramo de peso.

IC AS	Cut-off	Sensibilidad (95%CI)	Especificidad (95%CI)	AUC (95% CI)	p-valor
<b>Indice estimulación</b>	2,020	100 (88,43%-100%)	100 (88,43%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	<0,0001
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	57,71	100 (88,43%-100%)	100 (88,43%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	<0,0001
<b>Grancima B</b>	157,40	93,33 (77,93%-99,18%)	96,67 (82,78%-99,92%)	0,9922 (0,9780-1,006)	<0,0001
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	19,98	100 (88,43%-100%)	100 (88,43%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	<0,0001

Tabla 7a. Exactitud de detección de los sujetos asintomáticos inmunocompetentes (IC AS) con las diferentes técnicas empleadas. CI: intervalo de confianza. AUC: área bajo la curva.

ISF AS	Cut-off	Sensibilidad (95%CI)	Especificidad (95%CI)	AUC (95% CI)	p-valor
<b>Indice estimulación</b>	2,242	88,89 (70,84%-97,65%)	100 (87,66%-100%)	0,9696 (0,9294-1,010)	<0,0001
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	19,55	100 (87,23%-100%)	100 (87,66%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	<0,0001
<b>Grancima B</b>	151,60	96,30 (81,03%-99,91%)	92,86 (76,50%-99,12%)	0,9815 (0,9520-1,011)	<0,0001
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	13,43	96,30 (81,03%-99,91%)	96,43 (81,65%-99,91%)	0,9907 (0,9711-1,010)	<0,0001

Tabla 8a. Exactitud de detección de los sujetos asintomáticos inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF AS) con las diferentes técnicas empleadas. CI: intervalo de confianza. AUC: área bajo la curva.

VIH AS	Cut-off	Sensibilidad (95%CI)	Especificidad (95%CI)	AUC (95% CI)	p-valor
<b>Indice estimulación</b>	2,160	100 (80,49%-100%)	100 (84,56%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	<0,0001
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	50,73	100 (79,41%-100%)	100 (85,18%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	<0,0001
<b>Grancima B</b>	363,90	92,31 (63,97%-99,81%)	95,65 (78,05%-99,89%)	0,9922 (0,9780-1,006)	<0,0001
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	50,24	87,50 (61,65%-98,45%)	100 (85,18%-100%)	0,9864 (0,9607-1,012)	<0,0001

Tabla 9a. Exactitud de detección de los sujetos asintomáticos infectados por el VIH (VIH AS) con las diferentes técnicas empleadas. CI: intervalo de confianza. AUC: área bajo la curva.

IC LV	Cut-off	Sensibilidad (95%CI)	Especificidad (95%CI)	AUC (95% CI)	p-valor
<b>Indice estimulación</b>	2,015	94,44 (72,71%-92,31%)	100 (75,29%-100%)	0,9576 (0,9053-1,010)	<0,0001
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	78,54	87,50 (61,65%-98,45%)	100 (75,29%-100%)	0,9457 (0,8709-1,021)	<0,0001
<b>Grancima B</b>	375,00	70,59 (44,04%-89,69%)	92,31 (63,97%-99,81%)	0,9050 (0,7909-1,019)	0,0001
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	19,45	82,35 (56,57%-96,20%)	84,62 (54,55%-98,08%)	0,7873 (0,5982-0,9765)	0,007

Tabla 10a. Exactitud de detección de la cura en pacientes inmunocompetentes (IC LV) con las diferentes técnicas empleadas. CI: intervalo de confianza. AUC: área bajo la curva.

ISF LV	Cut-off	Sensibilidad (95%CI)	Especificidad (95%CI)	AUC (95% CI)	p-valor
<b>Indice estimulación</b>	2,626	100 (76,84%-100%)	100 (47,82%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	0,001
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	77,66	92,86 (66,13%-99,82%)	100 (47,82%-100%)	0,9714 (0,9027-1,040)	0,002
<b>Grancima B</b>	115,80	92,86 (66,13%-99,82%)	80 (28,36%-99,49%)	0,9429 (0,8242-1,061)	0,004
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	11,64	71,43 (41,90%-91,61%)	100 (47,82%-100%)	0,9643 (0,8798-1,049)	0,002

Tabla 11a. Exactitud de detección de la cura en pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF LV) con las diferentes técnicas empleadas. CI: intervalo de confianza. AUC: área bajo la curva.

VIH LV	Cut-off	Sensibilidad (95%CI)	Especificidad (95%CI)	AUC (95% CI)	p-valor
<b>Indice estimulación</b>	2,381	94,44 (72,71%-92,31%)	100 (36,79%-100%)	1,000 (1,000-1,000)	0,008
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	31,48	96,15 (80,36%-979,90%)	100 (47,82%-100%)	0,8400 (0,6274-1,053)	0,037
<b>Grancima B</b>	297,20	70 (34,75%-93,33%)	100 (47,82%-100%)	0,7600 (0,5104-1,010)	0,114
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	34,78	60 (26,24%-87,84%)	80 (28,36%-99,49%)	0,7400 (0,4868-0,9932)	0,142

Tabla 12a. Exactitud de detección de la cura en pacientes infectados por el VIH (VIH LV) con las diferentes técnicas empleadas. CI: intervalo de confianza. AUC: área bajo la curva.

A	<b>Respuesta linfoproliferativa PHA</b> <b>Media ±DS</b>
C IC	8,21 ± 4,66
AS IC	7,76 ± 4,07

D	<b>Respuesta linfoproliferativa PHA</b> <b>Media ±DS</b>
LVA IC	6,64 ± 3,61
LVC IC	7,39 ± 3,05

B	<b>Respuesta linfoproliferativa PHA</b> <b>Media ±DS</b>
C ISF	7,41 ± 3,85
AS ISF	6,049 ± 3,34

E	<b>Respuesta linfoproliferativa PHA</b> <b>Media ±DS</b>
LVA ISF	8,42± 5,45
LVC ISF	6,89 ± 4,12

C	<b>Respuesta linfoproliferativa PHA</b> <b>Media ±DS</b>
C VIH	4,99 ± 1,28
AS VIH	5,2 ± 0,97

F	<b>Respuesta linfoproliferativa PHA</b> <b>Media ±DS</b>
LVA VIH	5,32 ± 2,46
LVC VIH	7,11 ± 3,24

Tabla 13 a. Resultados de la respuesta linfoproliferativa tras la estimulación con PHA media ± la desviación estándar (DS) de los controles negativos (C) y los asintomáticos (AS) para *Leishmania*: a) inmunocompetentes (IC), b) inmunosuprimidos farmacológicamente, c) VIH+; resultados de la respuesta linfoproliferativa tras la estimulación con PHA media ± la desviación estándar (DS) de los pacientes con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curados (LVC: d) inmunocompetentes (IC), e) inmunosuprimidos farmacológicamente, f) VIH+.

Resultados de los niveles de las poblaciones celulares circulantes NK-T de todos los sujetos evaluados.

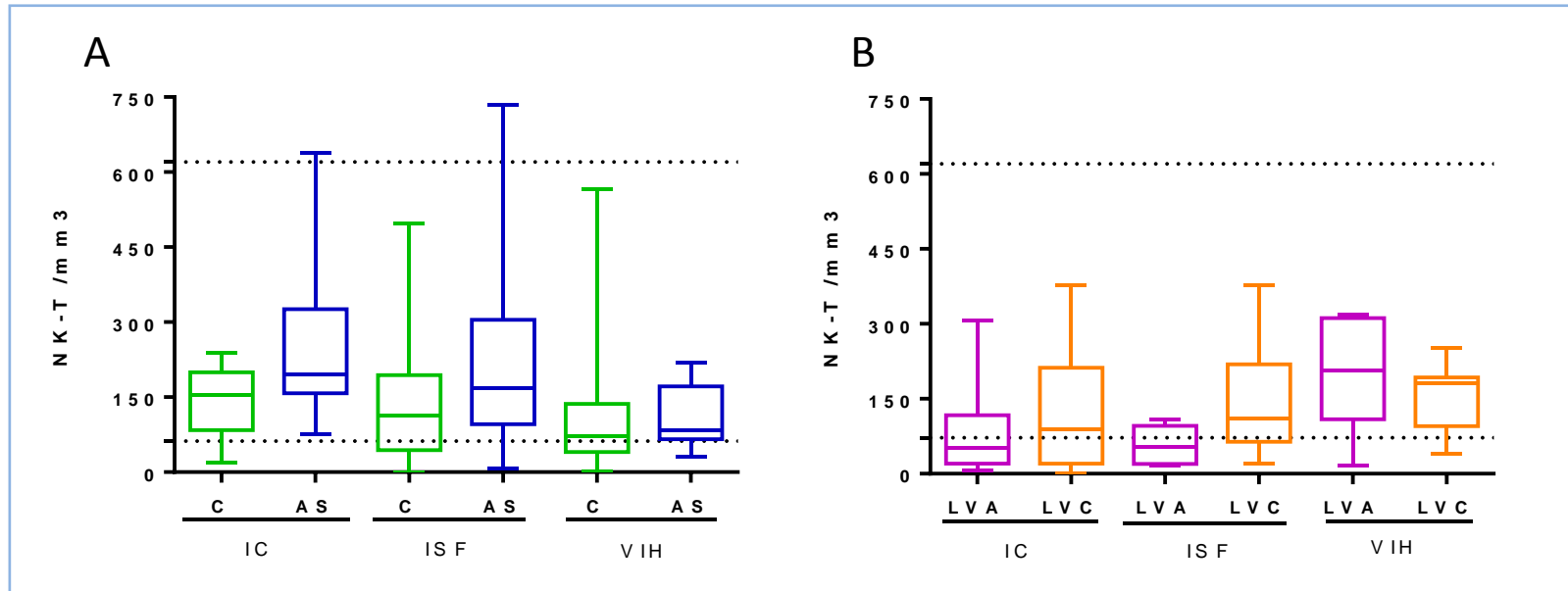


Figura 1a. Niveles de células NK-T (a) de los sujetos inmunocompetentes controles negativos (C) y asintomáticos (AS) para *Leishmania* y (b) de los pacientes inmunocompetentes (IC), inmunosuprimidos farmacológicamente (ISF) y VIH con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC).

Resultados de la respuesta linfoproliferativa y la producción de citoquinas y granzima B de los 11 pacientes inmunocompetentes activos y curados evaluados.

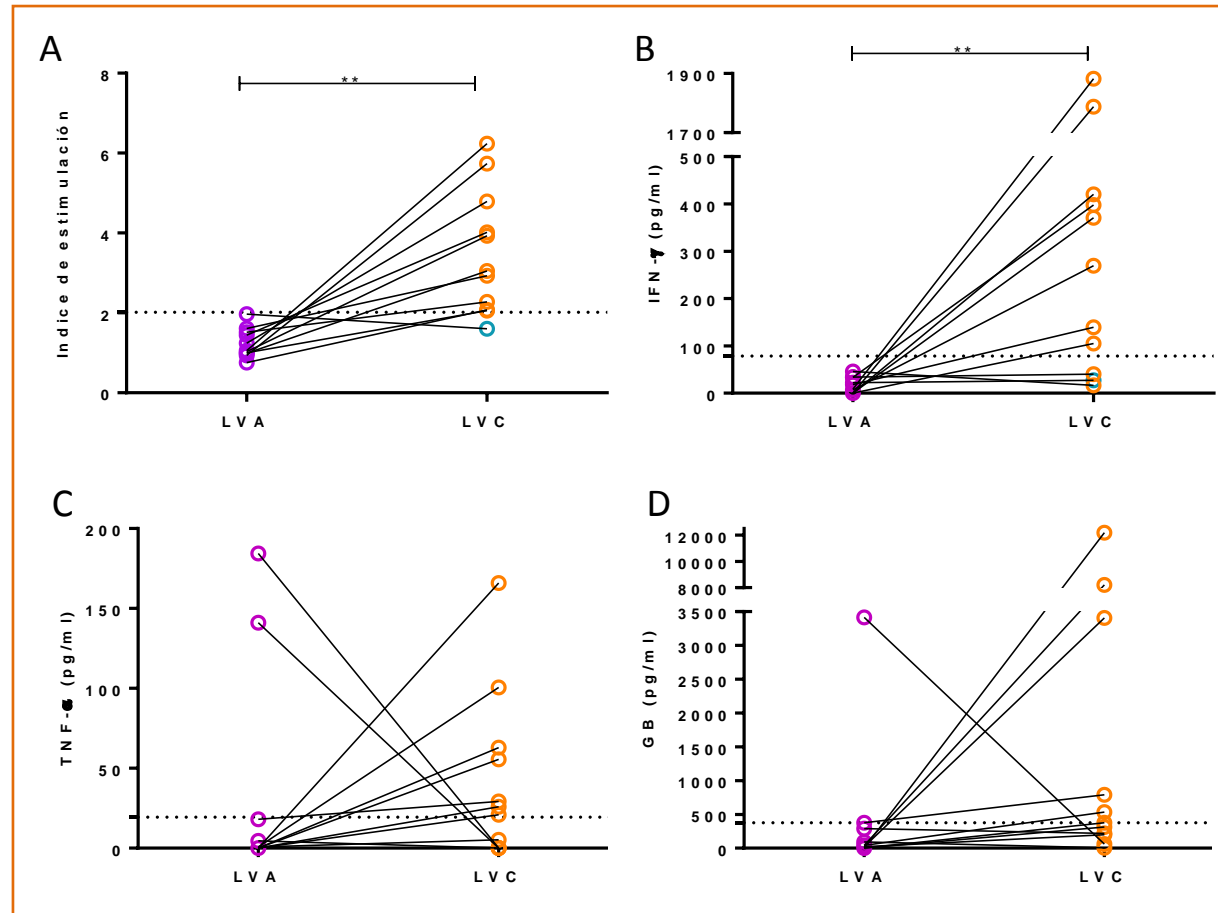


Figura 2a. (a) Respuesta linfoproliferativa expresada como índice de estimulación frente al antígeno SLA de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC). Producción de citoquinas tras la estimulación con SLA de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC) (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.

Resultados de la respuesta linfoproliferativa y la producción de citoquinas y granzima B de los 5 pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con enfermedad activa y curados evaluados.

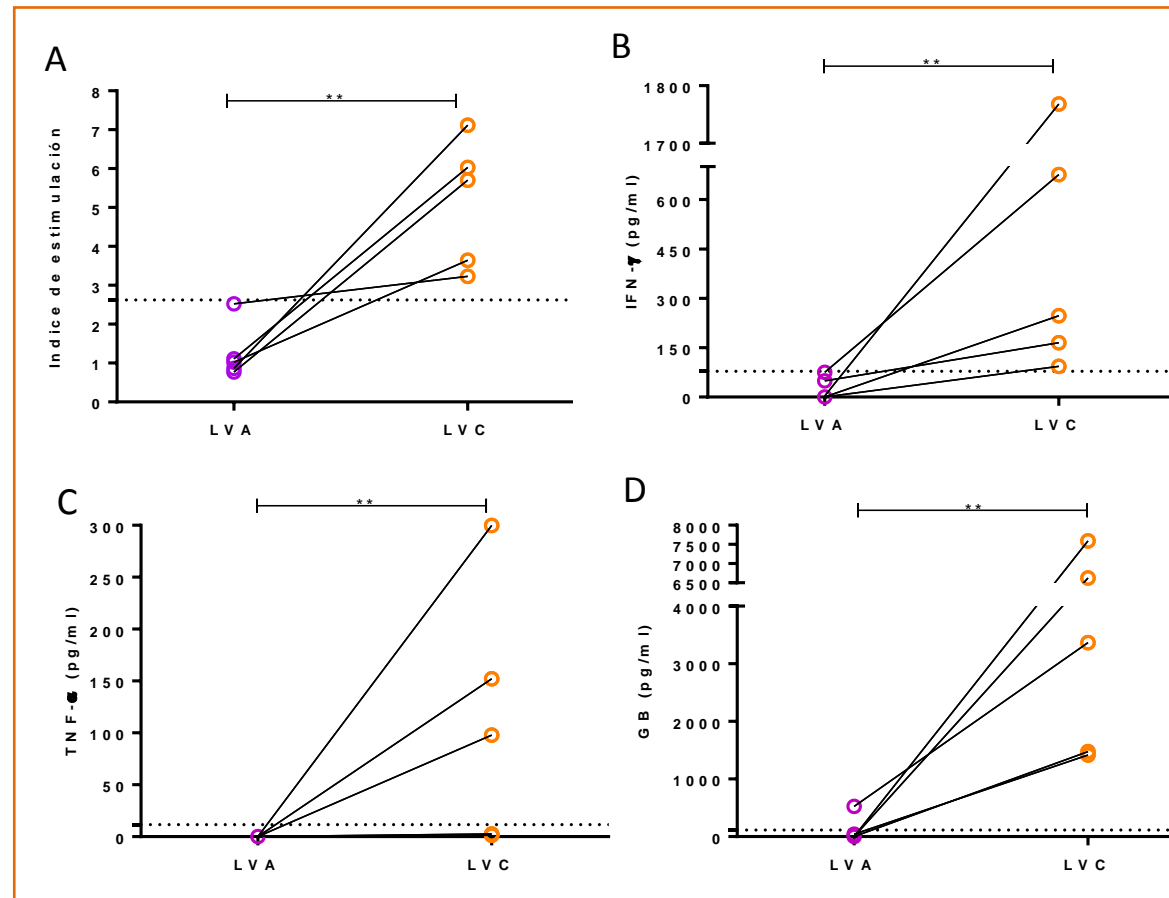


Figura 3a. (a) Respuesta linfoproliferativa expresada como índice de estimulación frente al antígeno SLA de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC). Producción de citoquinas tras la estimulación con SLA de los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente con leishmaniasis visceral activa (LVA) y curada (LVC) (b) IFN- $\gamma$  (c) TNF- $\alpha$  (d) Granzima B.



## Lymphoproliferative response after stimulation with soluble leishmania antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients

Alicia Castro<sup>a,c,\*</sup>, Eugenia Carrillo<sup>b,\*\*,1</sup>, Juan V. San Martín<sup>a,\*\*</sup>, Laura Botana<sup>b</sup>, Laura Molina<sup>a</sup>, Belén Matía<sup>a,c</sup>, Laura Fernandez<sup>b</sup>, Luis Horrillo<sup>a,c</sup>, Ana Ibarra-Meneses<sup>b</sup>, Carmen Sanchez<sup>b</sup>, Jose M. Ruiz-Giardín<sup>a</sup>, Javier Moreno<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Hospital Universitario Fuenlabrada, Madrid, Spain

<sup>b</sup> WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 May 2016

Received in revised form 22 August 2016

Accepted 8 September 2016

Available online 28 September 2016

#### Keywords:

Visceral leishmaniasis

Lymphoproliferative response

HIV

Relapse

Marker

### ABSTRACT

The introduction of HAART resulted in the decrease of *Leishmania*/HIV co-infection cases; nevertheless, the number of relapses remains high and secondary prophylaxis is recommended. However, secondary prophylaxis is not necessary in all patients, and presents a high risk of toxicity and an elevated cost. Our aim was to study whether specific cellular response to *Leishmania infantum* (measured by cell proliferation response after stimulation with soluble *Leishmania* antigen (SLA)), could be a useful tool to attempt a secondary prophylaxis withdrawal. In June 2009 an outbreak of leishmaniasis by *Leishmania infantum* was declared in the southeast of Madrid, and since January 2013, we recruited 10 HIV+ patients that had been treated for visceral leishmaniasis. 6 patients had positive SLA-cell proliferation test. The mean CD4 cell counts of those patients with positive SLA were 140 cel/mm<sup>3</sup> and 40 cel/mm<sup>3</sup> in those with negative SLA test. 3 patients with positive SLA-cell proliferation test (CD4 count: 336, 307, 625) were not on prophylaxis, and the other 3 patients (CD4 count: 152, 189, 359) were on secondary prophylaxis that was withdrawn after the positive SLA-cell proliferation test with no posterior relapses (mean follow up 60 weeks). From the 4 patients, which had negative SLA-cell proliferation test and continued on prophylaxis, 3 had positive PCR for *Leishmania* at the end of the follow-up and 2 presented clinical relapses.

The performance of SLA-cell proliferation test can be a useful tool that can permit us to try withdrawal of the prophylaxis in *Leishmania*/HIV co-infected patients with low CD4<sup>+</sup> counts under clinical supervision, diminishing risk of toxicity and cost.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 1. Background and objectives

Leishmaniasis is an infectious vector borne disease caused by the protozoan *Leishmania spp.*, which is transmitted by the bite of female sandflies of the *Phlebotomus* genus. Leishmaniasis is widely distributed throughout the world, and it is endemic in 98 countries, with an estimated incidence of 2 million new cases per year. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical form

because of its high morbidity and mortality. There are approximately 58,000 annual deaths and 235,7000 disability-adjusted life years lost caused by VL, although it is thought to be a high under-reported rate (Alvar et al., 2012).

In the Mediterranean region, VL is caused by *L. infantum* specie and it is considered to be hypoendemic (Monge-Maillo et al., 2014). In this region, the majority of the cases have been reported in Albania, Turkey, Italy, and Spain. *Leishmania*/HIV coinfection has been an emergent problem in the last two decades and has been reported in 35 endemic countries being Spain the one reporting most of the cases (Desjeux and Alvar, 2003). The number of new cases has decreased in Europe after the introduction of the HAART therapies in the end of the 90 s (López-Vélez et al., 2001; Fernández Cotarelo et al., 2003; Ter Horst et al., 2008).

\* Corresponding author at: Camino del Molino s/n. Fuenlabrada, Madrid, CP 28942, Spain.

\*\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [aleceya85@gmail.com](mailto:aleceya85@gmail.com) (A. Castro), [ecarrillo@isciii.es](mailto:ecarrillo@isciii.es)

(E. Carrillo), [juanvictor.san@salud.madrid.org](mailto:juanvictor.san@salud.madrid.org) (J.V. San Martín).

<sup>1</sup> Alicia Castro and Eugenia Carrillo contributed equally to this manuscript.

**Table 1**  
Clinical characteristics of HIV patients at the moment of the visceral leishmaniasis diagnosis.

	Sex	Age	HIV RF <sup>a</sup>	Origin	CD4 count (cells/ $\mu$ l)	HAART <sup>b</sup>	Treatment (mg/kg)	Secondary Prophylaxis
Patient 1	Male	44	PDU	Spain	99	No	Liposomal amphotericin B(30)	Antimonials
Patient 2	Male	33	Hetero	Nigeria	4	No	Liposomal amphotericin B(32)	Liposomal amphotericin B
Patient 3	Male	34	Hetero	Peru	29	No	Liposomal amphotericin B(30)	Liposomal amphotericin B
Patient 4	Female	41	Hetero	Equatorial Guinea	305	TDF/FTC/EFV	Liposomal amphotericin B(40)	Liposomal amphotericin B
Patient 5	Male	46	Hetero	Spain	46	No	Liposomal amphotericin B(22)	Antimonials
Patient 6	Male	33	Hetero	Nigeria	322	No	Liposomal amphotericin B(40)	Liposomal amphotericin B
Patient 7	Female	18	Vertical	Equatorial Guinea	16	No	Liposomal amphotericin B(21)	Liposomal amphotericin B
Patient 8	Male	54	MSM	Spain	104	TDF/FTC+ LPVr	Liposomal amphotericin B(39)	Liposomal amphotericin B
Patient 9	Male	44	PDU	Spain	46	No	Liposomal amphotericin B(31)	Antimonials
Patient 10	Male	37	MSM	Poland	48	No	Liposomal amphotericin B(40)	Liposomal amphotericin B

<sup>a</sup> HIV RF: Risk factor for HIV infection.

<sup>b</sup> HAART: highly active antiretroviral therapy.

The immunosuppressed status of HIV patients is a well-known risk factor for developing visceral leishmaniasis, but also for a poor clinical response and high risk of relapse after treatment (van Griensven et al., 2014). Therefore, it is recommended to maintain secondary prophylaxis after the treatment of the first episode of VL (López-Vélez et al., 2001; Alvar et al., 2008; WHO, 2010; Panel, 2016). However, this secondary prophylaxis is not necessary in all patients; besides, it presents a high risk of toxicity and an elevated cost. Thus, it is preferable to maintain the secondary prophylaxis only in those patients who show predicting factors of relapse. Until now, several predictor factors associated with treatment failure have been described in co-infected patients: the incapability of the patient to increase the CD4 cell count, having a history of previous relapses, and a CD4 cell count below 100 cel/ $\mu$ l (Cota et al., 2011). These aspects are taken into account to maintain secondary prophylaxis. Nevertheless, there have been VL relapses described in patients with CD4 cell counts which are higher than 200 cel/ $\mu$ l (Ter Horst et al., 2008; Villanueva et al., 2000). In addition, HIV-seropositive patients with severe and prolonged reduction of CD4 cell counts did not develop VL (Kubar et al., 1998). This fact, suggests the presence of other factors than CD4 cell levels, not yet described, that might affect the therapy response, and represent a great difficulty in establishing a safe CD4 cell count in which the withdrawal of secondary prophylaxis is secure.

HAART therapy alone seems to be insufficient to prevent VL relapse (Ter Horst et al., 2008; van Griensven et al., 2014; Cota et al., 2011; Casado et al., 2001). Despite the fact that HAART therapy increases the CD4 cell count, the studies performed with VL patients receiving HAART, showed a similar rate of relapse than studies carried out in the pre HAART era (van Griensven et al., 2014; Cota et al., 2011; Villanueva et al., 2000). Therefore, there are no secure recommendations for the maintenance of secondary prophylaxis. Some experts recommend maintaining it indefinitely. Some others suggest to withdraw it in selected patients who have >200–350 cel/ $\mu$ l CD4<sup>+</sup> cell counts and have not presented any relapses in the last 6 months, with undetectable viral load for more than 3 months, and preferably with negative PCR for *Leishmania* in blood. There are even recommendations of reinitiating prophylaxis if the CD4<sup>+</sup> cell counts fall below 200 cel/ $\mu$ l (WHO, 2010; Panel, 2016; Casado et al., 2001; Berenguer et al., 2000).

In the other hand, since it is not easy to define the criteria to keep the secondary prophylaxis or not, another possible approach is to establish, with a higher degree of accuracy, the patients who do not need secondary prophylaxis. This would help to reduce toxicity and high costs of unnecessary treatments.

In immunocompetent patients with VL, the successful response to therapy depends on the activation of the IFN- $\gamma$ , which produces a Th1 subset of CD4 positive *Leishmania*-specific T cells, resulting in a complete cure without relapses (Kemp et al., 1993). The lymphoproliferative response after stimulation with soluble antigen of *Leishmania* (SLA), has been proposed as an immunolog-

ical marker of a good *Leishmania*-specific Th1 response after the infection (Hailu et al., 2005), so it could be useful as a predictor of cure and would indicate that there is no risk of relapse after a first episode of visceral leishmaniasis.

In June 2009 an outbreak of leishmaniasis by *Leishmania infantum* was declared in the southeast of Madrid, with most of the cases reported in the city of Fuenlabrada. More than 400 cases have been reported, 160 VL, being the 10% of them in HIV+ patients (Arce et al., 2013), and 13 have been treated in the Hospital of Fuenlabrada. Under these circumstances, our aim was to evaluate the utility of the SLA-specific cell proliferation test as a useful tool to assess the withdrawal of secondary prophylaxis in HIV+ patients, without a posterior risk of relapse, and also to enable us to predict relapses when specific cellular response is lost. This procedure would improve the therapeutic management of these patients, the healing criteria definition, and would facilitate the possibility of withdrawing the secondary prophylaxis to *Leishmania*/HIV- coinfected patients under certain situations.

## 2. Material and methods

The ethical committee of Fuenlabrada University Hospital approved the study, and all patients gave their consent for the performance of the blood test. We considered recruitable, all HIV positive patients that were followed-up in our hospital during the five years of the study, that presented an episode of visceral leishmaniasis, and who gave their consent for the extraction of blood samples, considering non-recruitable, patients that were under 18 years old, and those that did not wanted to donate their consent.

Since the 2009 outbreak until 2015, 13 HIV infected patients have been diagnosed of visceral leishmaniasis. All the clinical data of adult patients with VL during the outbreak was prospectively collected, and after the hospital discharge, there was a patient follow-up until 1st of September 2015. From these 13 patients, two patients had already been treated of a previous visceral leishmaniasis episode. We were able to perform the follow up in 10 patients, this was due to the loss of the follow up of a patient that did not return to the hospital, and two other patients that died of *Leishmania* non-related diseases (cirrhosis and progressive multifocal leukoencephalopathy).

The clinical characteristics of the patients at the moment of the diagnosis of visceral leishmaniasis are presented in Table 1.

Since January 2013, we recruited all these 10 HIV+ patients that had been treated for VL, for SLA tests. Blood samples were collected to perform cell proliferation assay stimulated with soluble antigen of *Leishmania* test (SLA test), IFAT serology, and quantitative PCR for *Leishmania*. At least two samples per patient were collected during the study period. The physicians in charge of the follow up of these patients were informed of the results of the tests, which enabled them to decide the best therapeutic measure in each case.

**Table 2**  
Patient characteristics at the beginning of the follow-up (first test).

Patient	Weeks <sup>a</sup>	HAAART <sup>b</sup>	Adherence	CD4 Counts (cells/ $\mu$ l)	SLA <sup>c</sup>	PCR Leishmania (parasites/ $\mu$ g)	IFAT <sup>d</sup>	RK39	Secondary Prophylaxis before tests	Secondary Prophylaxis after tests	Relapse
Patient 1	61	TDF/FTC + DRVr	Correct	68	Negative	809	1/640	+	Yes	Continued	Relapse
Patient 2	99	TDF/FTC + DRVr	Irregular	7	Negative	327	1/320	+	No <sup>e</sup>	Restarted	Relapse
Patient 3	72	ABC/3TC + DRVr	Correct	154	Negative	3326	1/160	+	Yes	Continued	No
Patient 4	37	TDF/FTC/EFV	Correct	336	Positive	Negative	1/40	+	No	No	No
Patient 5	329	DRVr + RAL + ETV	Correct	307	Positive	Negative	1/160	Negative	No	No	No
Patient 6	48	ABC/3TC + EFV	Correct	625	Positive	Negative	1/80	Negative	No	No	No
Patient 7	106	TDF/FTC/RPV	Correct	189	Positive	Negative	1/40	Negative	Yes	Withdrawn	No
Patient 8	234	TDF/FTC + LPVr	Correct	359	Positive	Negative	1/80	Negative	Yes	Withdrawn	No
Patient 9	50	ABC/3TC + LPVr	Correct	136	Negative	Negative	1/80	Negative	Yes	Continued	No
Patient 10	83	TDF/FTC/EFV	Correct	152	Positive	Negative	1/40	Negative	Yes	Withdrawn	No

<sup>a</sup> Time after treatment in weeks since the end of the treatment and the performance of the tests.

<sup>b</sup> HAAART: highly active antiretroviral therapy. TDF: Tenofovir; FTC: Emtricitabine; DRVr: Darunavir/ritonavir; ABC: Abacavir; 3TC: Lamivudine; EFV: Efavirenz; RAL: Raltegravir; ETV: Etravirine; RPV: Rilpivirine; LPVr: Lopinavir/ritonavir.

<sup>c</sup> Stimulation with *Leishmania* antigen.

<sup>d</sup> Immunofluorescent antibody titre.

<sup>e</sup> Secondary prophylaxis was indicated, but there was no adherence to the treatment.

All statistical analyses were conducted using the statistical software package SPSS 11.5 (Chicago, IL, USA). The quantitative variables appear as the medias and standard deviations. Normal quantitative variables were compared using an analysis of variance (ANOVA) test.

The following definitions were used:

- Exposed to *Leishmania* (infected): defined as patients with documented infection by at least one of the next test:
  - Visualization of *Leishmania* by microscope in bone marrow.
  - Isolation of the parasite from PBMCs in NNN medium culture.
  - DNA detection by PCR in blood or other tissue samples.
  - Positive by serology using rK39 technics (qualitative) or by IFI dilution superior to 1/40.
  - Positive cell proliferation after SLA stimulation (stimulation index higher than 1.74).
- Relapse: reappearance of clinical disease after response to initial treatment.

### 2.1. Laboratory methods

1. Preparation of soluble *L. infantum* antigen (SLA): *L. infantum* antigen extract was prepared from sonicated promastigotes (JPC strain, MCAN/ES/98/LLM-722), and protein quantification was performed using Bicinchoninic acid (BCA) (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, USA).
2. Stimulation of peripheral blood mononuclear cells *in vitro*: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood samples, and cultured in triplicate for 5 days in the presence of SLA (10 microgr/ml). Cell proliferation was measured by bromodeoxyuridine incorporation using the Cell Proliferation Biotrak ELISA kit (General Electric Healthcare Life Sciences, UK). The results are shown as stimulation index (SI) for the antigen. The cut-off for positive lymphoproliferation was calculated as the mean + 3 SD (standard deviation) of the SI for 51 *Leishmania*-exposed but negative HIV subjects and it corresponds to a value of SI = 1.74.
3. Immunofluorescent antibody titre (IFAT) analyses of plasma samples were performed using  $2 \times 10^5$  *L. infantum* promastigotes in PBS per well (MCAN/ES/98/LLM-722). Plasma was assayed as two-fold serial dilutions from 1/20 to 1/640 in PBS to determine total IgG levels using fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human IgG (Fluoline G) (Bio-Mérieux, France) diluted 1/200, and threshold titer for positivity was set at 1/40.
4. rK39-ICT dipsticks were purchased from Leti Laboratories and the corresponding test was performed following the manufacturer's instructions.
5. DNA isolation and real time PCR: DNA isolation and real time PCR (qPCR) were performed as described by Cunha et al. (2013). Briefly, DNA was extracted from 100  $\mu$ L of peripheral blood by conventional phenol-chloroform extraction and eluted in 100  $\mu$ L of sterile distilled water. For qPCR, 1000 nM of R223 and 500 nM of R333 primers (Sigma-Aldrich, USA) for the small subunit rRNA (SSUrRNA) sequence were used. Total DNA was used as a template in touchdown qPCR reactions involving the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Applied Science, Switzerland).

NNN culture of PBMCs: The presence/absence of *Leishmania* was checked for every week up to 4 weeks.

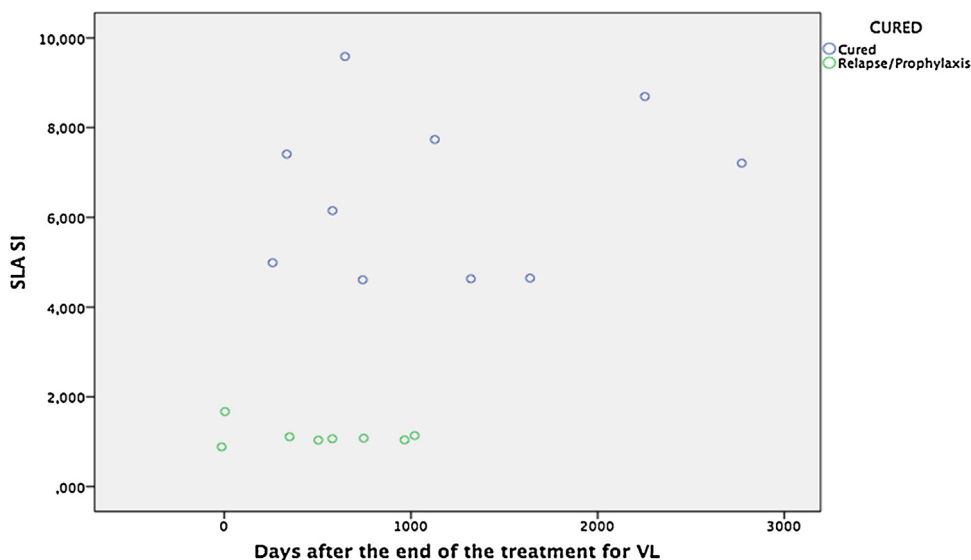
**Table 3**  
Characteristics of the patients at the end of the follow-up (last test).

	Follow-up time (days)	HAART <sup>a</sup>	Adherence	Secondary prophylaxis	Last CD4 counts.	SLA <sup>b</sup>	PCR <i>Leishmania</i> (parasites/ $\mu$ g)	IFAT <sup>c</sup>	Rk39
Patient 1	167	3TC + DRVr + MRC	Correct	Yes	121	Negative	29	1/160	+
Patient 2	161	TDF/FTC + DRVr	Irregular	Yes	68	Negative	2888	1/160	-
Patient 3	138	ABC/3TC + DRVr	Correct	Yes	111	Negative	4092	1/160	+
Patient 4	92	TDF/FTC/EFV	Correct	No	601	Positive	Negative	Negative	+
Patient 5	394	DRVr + RAL + ETV	Correct	No	322	Positive	Negative	1/80	Negative
Patient 6	160	ABC/3TC + EFV	Correct	No	867	Positive	Negative	1/40	Negative
Patient 7	161	TDF/FTC/RPV	Correct	No	345	Positive	Negative	1/80	Negative
Patient 8	300	TDF/FTC + LPVr	Correct	No	219	Positive	Negative	1/80	Negative
Patient 9	146	ABC/3TC + RAL	Correct	Yes	166	Negative	Negative	1/40	Negative
Patient 10	189	TDF/FTC/EFV	Correct	No	263	Positive	Negative	1/40	Negative

<sup>a</sup> HAART: highly active antiretroviral therapy. 3TC: Lamivudine; DRVr: Darunavir/ritonavir; MRC: Maraviroc; TDF: Tenofovir; FTC: Emtricitabine; ABC: Abacavir; EFV: Efavirenz; RAL: Raltegravir; ETV: Etravirine; RPV: Rilpivirine; LPVr: Lopinavir/ritonavir.

<sup>b</sup> Stimulation with *Leishmania* antigen.

<sup>c</sup> Immunofluorescent antibody titre.



**Fig. 1.** Soluble antigen of *Leishmania* (SLA) Stimulation Index (SLA SI), after the end of VL treatment.

Positive test: SLA SI  $\geq 1.74$ .

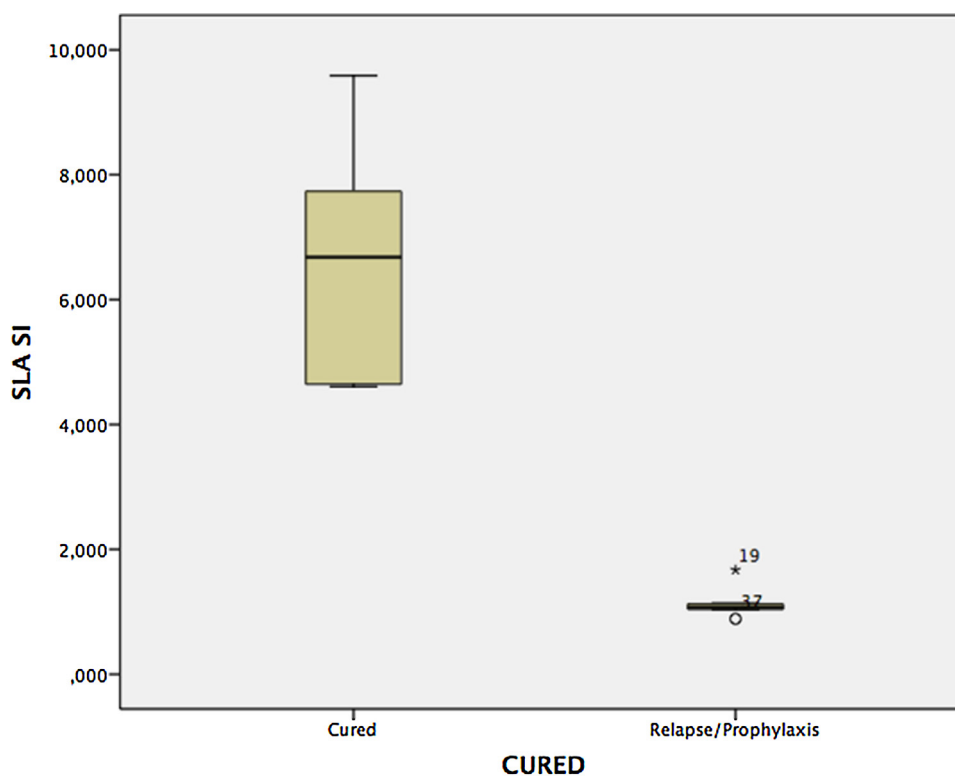
### 3. Results

Clinical findings regarding VL in the 10 patients we followed-up, did not differ from those found in immunocompetent patients. Most of the patients presented VL manifestations; including weight loss, hepato-splenomegaly, and pancytopenia, with the exception that fever appeared only in 6 patients (67%). All patients were treated with liposomal amphotericin B followed by secondary prophylaxis after the end of the treatment (Table 1). Table 2 shows the characteristics of the patients at the beginning of the follow up, when the first test was made. Six out of ten patients had positive SLA-cell proliferation test. The mean CD4 cell counts of those patients with positive SLA were 140.2 cel/mm<sup>3</sup>, and 40.5 cel/mm<sup>3</sup> in those with SLA-negative cell proliferation test ( $p = 0.22$ ). Three patients with positive SLA-cell proliferation test were not on prophylaxis (it had been withdrawn before the beginning of the study), and the other 3 patients (CD4 count: 152, 189, 359) were on secondary prophylaxis. Nevertheless, secondary prophylaxis was withdrawn in these patients after the positive SLA-cell proliferation test was obtained with no relapses (mean duration of the follow up: 60 weeks). Four patients with negative SLA-cell proliferation test continued on prophylaxis, 3 of them had positive PCR for *Leishmania* at the end of the follow up, and 2 presented clinical relapses and were re-treated. The clinical status of all the patients at the end of follow up is showed on Table 3. Fig. 1 shows the results of SLA Stimulation Index

(SLA SI) in cell proliferation tests and Fig. 2 the comparative media results in cured patients versus relapsing patients and patients still in prophylaxis.

### 4. Discussion

The introduction of HAART for the treatment of HIV infection has resulted in the decrease of HIV/*Leishmania* co-infection cases, which is associated with the increase of CD4 cell count induced by this treatment. The combination of HAART and secondary prophylaxis for VL has achieved a lower incidence of VL cases in HIV/*Leishmania* co-infected patients (López-Vélez et al., 2001). However, the number of relapses remains high in some patients on HAART and prophylaxis, mainly in patients with low CD4 cell count (Alvar et al., 2008). Classically, the CD4 cell count  $< 200$  cel/ $\mu$ l has been the parameter related to the risk of developing primary VL and has also shown to be determinant for relapses (Cota et al., 2011). Therefore, it has traditionally been used to decide whether or not, a patient should be administered secondary prophylaxis (Alvar et al., 2008; WHO, 2010; Panel, 2016; Ter Horst et al., 2008; Kubar et al., 1998). Visceral leishmaniasis, unlike other opportunistic infections, can occur with CD4 cell counts that are higher than 200 cel/ $\mu$ l (Ter Horst et al., 2008; Villanueva et al., 2000). There is evidence that other factors, different from the CD4 cell counts, are involved in the susceptibility of HIV+ patients to present a pri-



**Fig. 2.** Soluble antigen of *Leishmania* (SLA) Stimulation Index (SLA SI), in relation to cured patients, after the end of VL treatment. Positive test: SLA SI  $\geq$  1.74. ANOVA  $p < 0.001$ .

mary *Leishmania* infection and posterior relapses (Alvar et al., 2008; Kubar et al., 1998). Apart from the general immunosuppression status expressed by the CD4 cell count, our aim in this work, was to confirm whether the specific cellular response to *Leishmania infantum* (measured by cell proliferation response after stimulation with soluble antigen of *Leishmania* (SLA)), was a useful tool to assess the existence of *Leishmania*-specific T cell memory clones, capable to keep the parasitic infection under control, to avoid relapses and, in consequence, attempt a secondary prophylaxis withdrawal in these patients.

Follow up of the co-infected patients after treatment showed that 6 out of 10 presented a positive SLA-cell proliferation test. All of these patients were left without prophylaxis for at least 60 weeks and presented no relapses during the whole period. The four remaining patients who were followed up presented a negative SLA test. One of them, with low CD4 cell count ( $<100$  cel/ $\mu$ l) took irregularly HAART and abandoned secondary prophylaxis, presenting a relapse. Another patient with low CD4 cell count ( $<100$  cel/ $\mu$ l), under regular HAART and secondary prophylaxis, also presented a relapse. The two other patients with negative SLA test, continue with secondary prophylaxis, and have not presented any relapses up to the moment. Nevertheless, it is interesting to point out, that one of these patients presents positive PCR for *Leishmania*, which suggests the presence of parasites in peripheral blood. These results support the fact that SLA-cell proliferation positive test is indicative of a cell-mediated immune response against the parasite and a good predictive marker of non-appearance of relapses in HIV patients co-infected with *Leishmania*.

All the patients in our cohort who presented a negative SLA-cell proliferation test had less than 200 CD4 cel/ $\mu$ l. However, we observed that 2 of the 6 patients with adequate cell response had less than 200 CD4 cel/ $\mu$ l counts when the prophylaxis was withdrawn, and 4 out of these 6 patients without prophylaxis at the

present time have less than 350 CD4 cel/ $\mu$ l count. Although the current recommendations are to use the CD4 count levels in order to recommend the maintenance or withdrawal of secondary prophylaxis, there is no clear evidence for this statement (WHO, 2010; Panel, 2016). Previous studies reveal the importance of maintaining a good CD4 cell count level, as well as developing an specific T cell response against *Leishmania* after treatment, in order to diminish the number of relapses (Moreno et al., 2000; Bourgeois et al., 2008). It is well known that co-infection has a synergic effect, facilitating the increase of HIV viral load and progression to AIDS, and that it favours uncontrolled multiplication of the parasites (van Griensven et al., 2014), finally reducing the capability of HAART therapy to increase CD4 counts. Besides, it has been shown that there is an specific interaction between *Leishmania* and HIV at a cellular level that mainly affects macrophages and dendritic cells, and that may result in the impairment of cell mediated immune response (Alvar et al., 2008). In consequence, in coinfecting patients, specific immunity to *Leishmania* is not only related to the CD4 count. Functional activity of these cells, as assessed in SLA cell proliferation test, should be taken into account, as a small number of memory T cells could be enough to build up a sufficient secondary immune response (Moreno et al., 2000).

During the outbreak in Madrid, a study in solid organ transplant recipients was performed, in order to test exposure and confirmation of cure in patients treated of VL. In this study, SLA tests were performed, and two patients did not present a positive lymphoproliferative response. One of them was serologically positive by IFAT and developed VL a few days after, and the other patient, was a patient that had been already treated for VL and was the only patient (out of six patients with previous VL episodes) who showed no lymphoproliferative response and relapsed four months after the test was performed. These results, although with their limi-

tations, reinforce our hypothesis in immunodepressed individuals (PLOS Neglected Tropical Diseases, 2016).

Another laboratory parameter, which shows encouraging results when applied to follow up of coinfecting patients, is the quantitative determination of parasite load by PCR. Various studies using real-time PCR demonstrated that relapses are preceded by an elevation of parasite levels measured by this method, in peripheral blood (Bourgeois et al., 2008; Antinori et al., 2007; Bossolasco et al., 2003; Mary et al., 2006). It is not well known how often these tests should be performed, nor which levels are clearly associated to a relapse. In our cohort, we found 3 patients with positive PCR, including the two patients that relapsed. The third one was asymptomatic but actually presented a higher parasitic load than the rest of the other patients that had presented clinical relapses. All these three patients presented negative SLA-cell proliferation test. The results of both parameters, lymphoproliferative response after stimulation with SLA and PCR presented no variations along the period of the study, which ranged from 55 to 112 weeks. This fact reinforces our results, which are consistent, showing a relationship between positive PCR and negative SLA-cell proliferation test, which supports the idea that both techniques could be used as complementary tests to follow up coinfecting patients after the withdrawal of secondary prophylaxis.

There are limitations to our study, and one of them was the small number of patients. Our results have limitations inherent to observational studies, which do not allow drawing any definitive conclusions because of the requirement of comparative clinical trials to be done. The unexpected outbreak did not allow us to design a randomized controlled trial, nor an observational prognostic study in which other factors associated with VL relapse were also studied. However, we think that our findings are consistent and promising enough to be investigated in future trials.

Another condition that has to be taken into account is that implementation of PBMC SLA stimulation assays may be difficult in certain situations, because is laborious and time-consuming. However, this technic has already been used in HIV patients with *Leishmania*, although this is the first time that it is used to study relapses and as a prognostic marker (Moreno et al., 2000). Due to the complexity of some of these laboratory tests, there has been development of whole blood assay (Quantiferon) techniques to detect asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic (Ibarra-Meneses et al., 2016), but there are no results published in *Leishmania*/HIV coinfection. The aim of the development of this technic is to have an easy rapid test that can help us to detect patients with a higher risk of relapse or development of the disease in HIV exposed patients in areas with high endemicity. There have been results published with these techniques assessing latent tuberculosis infection in HIV patients, although there are still certain limitations concerning these results in patients with severe immunosuppression (Cattamanichi et al., 2011; Aichelburg et al., 2014).

In conclusion, we think that the performance of lymphoproliferative response test after stimulation with soluble antigen of *Leishmania* (SLA), can be a tool which may enable us to withdraw the prophylaxis in patients under frequent clinical supervision that have not achieved  $>200$  cel/ $\mu$ l CD4 cell counts. This could diminish the administration of drugs with many side effects, that are expensive, and which have proven to be insufficient to prevent relapses. Further investigation is needed and we suggest the incorporation of SLA test in future trials.

## Conflicts of interest

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

## Funding

This study received financial support from the 'Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET+RD12/0018/0008), VI PN de I+D+I 2008–2011, ISCIII–Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa; y fondos FEDER, and from ISCIII-AES project Impact of leishmaniasis outbreak in the southwest of Madrid in the immunosuppressed population (PI13/00440). EC was supported by a research contract funded via VII PN I+D+I 2013–2016 and FEDER Funds (RICET RD12/0018/0003).



## References

- Aichelburg, M.C., Reiberger, T., Breitenacker, F., Mandorfer, M., Makristathis, A., Rieger, A., 2014. Reversion and conversion of interferon- $\gamma$  release assay results in HIV-1-infected individuals. *J. Infect. Dis.* 209 (March (5)), 729–733.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J.-P., et al., 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 21 (April (2)), 334–359, table of contents.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al., 2012. WHO Leishmaniasis Control Team Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7 (5), e35671.
- Antinori, S., Calattini, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Magni, C., et al., 2007. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 44 (June (12)), 1602–1610.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., et al., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid Spain, 2009–2012. *Eurosurveillance* 18 (July (25)), 20546.
- Berenguer, J., Cosin, J., Miralles, P., López, J.C., Padilla, B., 2000. Discontinuation of secondary anti-leishmania prophylaxis in HIV-infected patients who have responded to highly active antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* 14 (December (18)), 2946–2948.
- Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., et al., 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 41 (November (11)), 5080–5084.
- Bourgeois, N., Lachaud, L., Reynes, J., Rouanet, I., Mahamat, A., Bastien, P., 2008. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 48 (May (1)), 13–19.
- Casado, J.L., Lopez-Velez, R., Pintado, V., Quereda, C., Antela, A., Moreno, S., 2001. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (March (3)), 202–205.
- Cattamanichi, A., Smith, R., Steingart, K.R., Metcalfe, J.Z., Date, A., Coleman, C., et al., 2011. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals – a systematic review and meta-analysis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 56 (March (3)), 230–238.
- Cota, G.F., de Sousa, M.R., Rabello, A., 2011. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (June (6)), e1153.
- Cunha, J., Carrillo, E., Sánchez, C., Cruz, I., Moreno, J., Cordeiro-da-Silva, A., 2013. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatotropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* 6 (April), 122.
- Desjeux, P., Alvar, J., 2003. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97 (Suppl 1), 3–15.
- Fernández Cotarelo, M.J., Abellán Martínez, J., Guerra Vales, J.M., Martínez Sánchez, P., Rodrigo Gómez De La Bárcena, M., Salto Fernández, E., 2003. Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 37 (October (7)), 973–977.
- Hailu, A., van Baarle, D., Knol, G.J., Berhe, N., Miedema, F., Kager, P.A., 2005. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin. Immunol.* 117 (November (2)), 182–191.
- Ibarra-Meneses, A.V., Carrillo, E., Sánchez, C., García-Martínez, J., López Lacomba, D., San Martín, J.V., et al., 2016. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. *Clin. Microbiol. Infect.*
- Kemp, M., Kurtzthals, J.A., Kharazmi, A., Theander, T.G., 1993. Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. *Immunol. Cell Biol.* 71 (December (Pt. 6)), 583–587.
- Kubar, J., Marty, P., Lelievre, A., Quaranta, J.F., Staccini, P., et al., 1998. Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. *AIDS* 12, 2147–2153.

- López-Vélez, R., Casado, J.L., Pintado, V., 2001. Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (July (7)), 394–395.
- Mary, C., Faraut, F., Drogoul, M.-P., Xeridat, B., Schleinitz, N., Cuisenier, B., et al., 2006. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75 (November (5)), 858–863.
- Monge-Maillo, B., Norman, F.F., Cruz, I., Alvar, J., López-Vélez, R., 2014. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (August (8)), e3021.
- Moreno, J., Cañavate, C., Chamizo, C., Laguna, F., Alvar, J., 2000. HIV–*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 (June (3)), 328–332.
- PLOS Neglected Tropical Diseases: Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to *Leishmania*, and for Confirming Cure from *Leishmaniasis*, in Solid Organ Transplant. Available: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004179>.
- Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Available at [http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult\\_oi.pdf](http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf) (accessed on 10.17.15.), page 288.
- Ter Horst, R., Collin, S.M., Ritmeijer, K., Bogale, A., Davidson, R.N., 2008. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin. Infect. Dis.* 46 (June (11)), 1702–1709.
- Villanueva, J.L., Alarcón, A., Bernabeu-Wittel, M., Cordero, E., Prados, D., Regordán, C., et al., 2000. Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19 (October (10)), 798–801.
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases, 2010. *Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*, Geneva, 22–26 March 2010. Geneva: World Health Organization, 186 p.
- van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L., Moreno, J., 2014. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 20 (April (4)), 286–299.



# *Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification

Giovanni Bussotti,<sup>a,b</sup> Evi Gouzelou,<sup>b</sup> Mariana Côrtes Boité,<sup>c</sup> Ihcen Kherachi,<sup>d</sup> Zoubir Harrat,<sup>d</sup> Naouel Eddaikra,<sup>d</sup>  Jeremy C. Mottram,<sup>e</sup> Maria Antoniou,<sup>f</sup> Vasiliki Christodoulou,<sup>f</sup> Aymen Bali,<sup>g,h</sup> Fatma Z. Guerfali,<sup>g,h</sup> Dhafer Laouini,<sup>g,h</sup> Maowia Mukhtar,<sup>i</sup>  Franck Dumetz,<sup>j</sup> Jean-Claude Dujardin,<sup>j,k</sup> Despina Smirlis,<sup>l</sup> Pierre Lechat,<sup>a</sup> Pascale Pescher,<sup>b</sup> Adil El Hamouchi,<sup>m</sup> Meryem Lemrani,<sup>m</sup> Carmen Chicharro,<sup>n</sup> Ivonne Pamela Llanes-Acevedo,<sup>n</sup> Laura Botana,<sup>n</sup> Israel Cruz,<sup>n</sup> Javier Moreno,<sup>n</sup> Fakhri Jeddi,<sup>h,o</sup> Karim Aoun,<sup>h,o</sup> Aïda Bouratbine,<sup>h,o</sup> Elisa Cupolillo,<sup>c</sup> Gerald F. Späth<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institut Pasteur—Bioinformatics and Biostatistics Hub—C3BI, USR 3756 IP CNRS, Paris, France

<sup>b</sup>Unité de Parasitologie moléculaire et Signalisation, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>c</sup>Laboratory on Leishmaniasis Research, Oswaldo Cruz Institute—Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup>Laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et Génétique des Populations, Institut Pasteur d'Algérie, Algérie

<sup>e</sup>Centre for Immunology and Infection, Department of Biology, University of York, York, United Kingdom

<sup>f</sup>Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, School of Medicine, University of Crete, Vassilika Vouton, Heraklion, Greece

<sup>g</sup>Laboratory of Transmission, Control and Immunobiology of Infections (LTCII), Institut Pasteur de Tunis, Tunis-Belvédère, Tunisia

<sup>h</sup>Université Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

<sup>i</sup>The Institute of Endemic Diseases, University of Khartoum, Khartoum, Sudan

<sup>j</sup>Molecular Parasitology Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

<sup>k</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

<sup>l</sup>Molecular Parasitology Laboratory, Microbiology Department, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

<sup>m</sup>Laboratory of Parasitology and Vector-Borne-Diseases, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

<sup>n</sup>WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>o</sup>Research Laboratory Medical Parasitology, Biotechnology and Biomolecules, Institut Pasteur de Tunis, Tunis-Belvédère, Tunisia

**ABSTRACT** Protozoan parasites of the genus *Leishmania* adapt to environmental change through chromosome and gene copy number variations. Only little is known about external or intrinsic factors that govern *Leishmania* genomic adaptation. Here, by conducting longitudinal genome analyses of 10 new *Leishmania* clinical isolates, we uncovered important differences in gene copy number among genetically highly related strains and revealed gain and loss of gene copies as potential drivers of long-term environmental adaptation in the field. In contrast, chromosome rather than gene amplification was associated with short-term environmental adaptation to *in vitro* culture. Karyotypic solutions were highly reproducible but unique for a given strain, suggesting that chromosome amplification is under positive selection and dependent on species- and strain-specific intrinsic factors. We revealed a progressive increase in read depth towards the chromosome ends for various *Leishmania* isolates, which may represent a nonclassical mechanism of telomere maintenance that can preserve integrity of chromosome ends during selection for fast *in vitro* growth. Together our data draw a complex picture of *Leishmania* genomic adaptation in the field and in culture, which is driven by a combination of intrinsic genetic factors that generate strain-specific phenotypic variations, which are under environmental selection and allow for fitness gain.

Received 29 June 2018 Accepted 18

September 2018 Published 6 November 2018

**Citation** Bussotti G, Gouzelou E, Côrtes Boité M, Kherachi I, Harrat Z, Eddaikra N, Mottram JC, Antoniou M, Christodoulou V, Bali A, Guerfali FZ, Laouini D, Mukhtar M, Dumetz F, Dujardin J-C, Smirlis D, Lechat P, Pescher P, El Hamouchi A, Lemrani M, Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, Botana L, Cruz I, Moreno J, Jeddi F, Aoun K, Bouratbine A, Cupolillo E, Späth GF. 2018. *Leishmania* genome dynamics during environmental adaptation reveal strain-specific differences in gene copy number variation, karyotype instability, and telomeric amplification. mBio 9:e01399-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01399-18>.

**Editor** Christian Tschudi, Yale University School of Public Health

**Copyright** © 2018 Bussotti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Gerald F. Späth, [gerald.spaeth@pasteur.fr](mailto:gerald.spaeth@pasteur.fr).

**IMPORTANCE** Protozoan parasites of the genus *Leishmania* cause severe human and veterinary diseases worldwide, termed leishmaniases. A hallmark of *Leishmania* biology is its capacity to adapt to a variety of unpredictable fluctuations inside its human host, notably pharmacological interventions, thus, causing drug resistance. Here we investigated mechanisms of environmental adaptation using a comparative genomics approach by sequencing 10 new clinical isolates of the *L. donovani*, *L. major*, and *L. tropica* complexes that were sampled across eight distinct geographical regions. Our data provide new evidence that parasites adapt to environmental change in the field and in culture through a combination of chromosome and gene amplification that likely causes phenotypic variation and drives parasite fitness gains in response to environmental constraints. This novel form of gene expression regulation through genomic change compensates for the absence of classical transcriptional control in these early-branching eukaryotes and opens new venues for biomarker discovery.

**KEYWORDS** *Leishmania*, aneuploidy, evolution, gene copy number variation, genomic adaptation, telomeric amplification

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* are transmitted by female blood-feeding sand flies and can cause severe diseases in infected humans and animals. The success of this pathogen relies on its capacity to sense changes in various host environments that trigger a series of distinct developmental transitions (1). Inside phlebotomine insect vectors, noninfectious procyclic promastigote parasites differentiate into highly infectious metacyclic promastigotes, which are transmitted to vertebrate hosts during a blood meal, where they develop into the disease-causing amastigote form inside host macrophages (2, 3). Aside from stage differentiation, *Leishmania* parasites seem to adapt to a variety of environmental fluctuations encountered in their hosts, with important consequences for infection outcome, such as drug treatment. Phenotypic shifts in *Leishmania* have been linked to genome plasticity, with frequent copy number variations (CNVs) of individual genes or chromosomes linked to drug resistance (4–9) or tissue tropism (10, 11). A better insight into molecular and genetic mechanisms underlying *Leishmania* genetic diversity and evolution of new phenotypes is therefore essential to understand parasite pathogenicity and hence the epidemiology of *Leishmania* infection.

Combining DNA sequencing (DNA-seq) and transcriptome sequencing (RNA-seq) analyses of karyotypically distinct *Leishmania donovani* field isolates and experimental clones, we recently established a direct correlation between transcript abundance and chromosome amplification (12, 13)—a form of genomic regulation of gene expression levels that compensates for the absence of classical transcriptional control in these early-branching eukaryotes (10, 14, 15). Using the *L. donovani* LD1S experimental strain and conducting *in vitro* evolutionary experiments, we demonstrated the highly dynamic, reversible, and reproducible nature of parasite karyotypic changes and correlated chromosome amplification to fitness gains in culture (13). Using recent clinical isolates of *L. donovani*, we demonstrated that such karyotypic changes were strain specific (12), suggesting a potential link between the genetic background of the parasite and its karyotype plasticity (12, 16). Despite the potential relevance of genomic adaptation in shaping the parasite pathogenic potential, only little is known about the dynamics of gene and chromosome CNVs in *Leishmania* field isolates while they evolve to adapt to new environments. Here we address this important open question by comparing the genomes of 10 clinical isolates belonging to three different *Leishmania* complexes (*L. donovani*, *L. major*, and *L. tropica*) from eight geographical regions. Read depth analysis revealed gene and chromosome CNVs as potential drivers of long-term and short-term adaptation, respectively. Isolates during early and later stages of culture adaptation showed reproducible karyotypic changes for a given strain, providing strong evidence that chromosomal amplification is under positive selection. Significantly, these changes occurred in an individualized manner in even highly related

strains, thus implicating for the first time environment-independent intrinsic genetic factors affecting *Leishmania* karyotypic adaptation.

## RESULTS

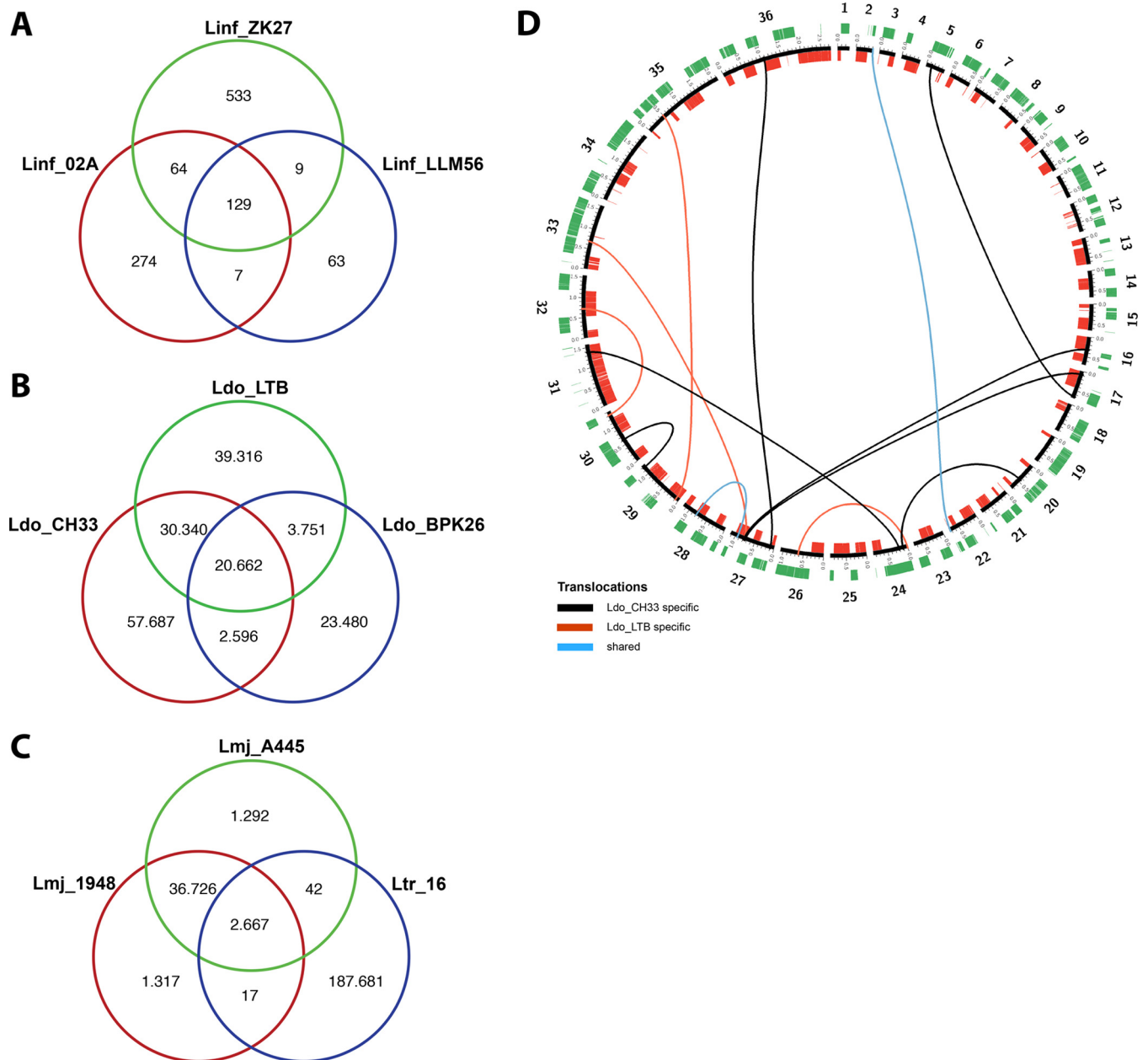
**Analyzing the evolutionary relationship among *Leishmania* strains.** Ten *Leishmania* strains belonging to the *L. tropica*, *L. major*, or *L. donovani* complexes were obtained from different sources and regions (see Materials and Methods and see Table S1 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]), and parasites from early passage (passage 2) and later culture passages (passage 5 [designated EP and EP + 3, respectively]) were subjected to sequencing analysis (see Fig. S1 in the supplemental material and Table S2 at GitLab).

We first used the EP sequence information to confirm species determination and to characterize strain-specific genetic variations that may inform on mechanisms of adaptation. Principal-component analysis (PCA) and clustering analyses based on the average nucleotide identity (ANI) among strains confirmed the molecular determination of the various *Leishmania* species (see Fig. S2A and B in the supplemental material), with *L. infantum* and *L. donovani* or *L. major* and *L. tropica* grouping together, respectively. Ldo\_CH33 grouped with other *L. donovani* strains, thus, confirming previous zymodeme analysis (17–19). Based on branch length that correlates with genetic distance, the *L. infantum* isolates Linf\_ZK27, Linf\_LLM56, Linf\_LLM45, and Linf\_02A are highly related, as was expected by their common epidemiological classification as MON-1 (see Table S1 at GitLab).

Comparison of the repertoires of high-frequency single-nucleotide variants (SNVs [ $>90\%$ ]) across the *L. infantum* isolates (Fig. 1A) confirmed the very close relationship among these samples despite their geographic distance, with less than 600 strain-specific SNVs observed for a given isolate. The majority of SNVs show a low frequency (data not shown), suggesting that nucleotide variants may not be under strong selection in this species. In contrast, the *L. donovani* strains are evolutionarily more distant, as judged by the presence of over 40,000 strain-specific SNVs, with high-frequency SNVs likely being associated with defined haplotypes that may be under selection, as previously suggested (13, 20), or may be the result of geographic separation and genetic drift (Fig. 1B).

Finally, the SNV analysis revealed the close genetic relationship between the Tunisian and Algerian *L. major* samples, with 36,726 SNVs shared between the strains compared to the reference genome (Fig. 1C). The massive amount of SNVs identified in *L. tropica* confirmed the large evolutionary distance to *L. major* strains observed by PCA and the clustering analyses (Fig. S2). Differences in the evolutionary relationship were further supported by the absence of inversions or translocations in the *L. major* and *L. infantum* strains compared to the corresponding reference genomes and the presence of translocations in the Cypriot Ldo\_CH33 strain and the Sudanese *L. donovani* strain Ldo\_LTB (Fig. 1D; see Table S6 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]), revealing a potential role of these structural genome variations in *L. donovani* adaptation.

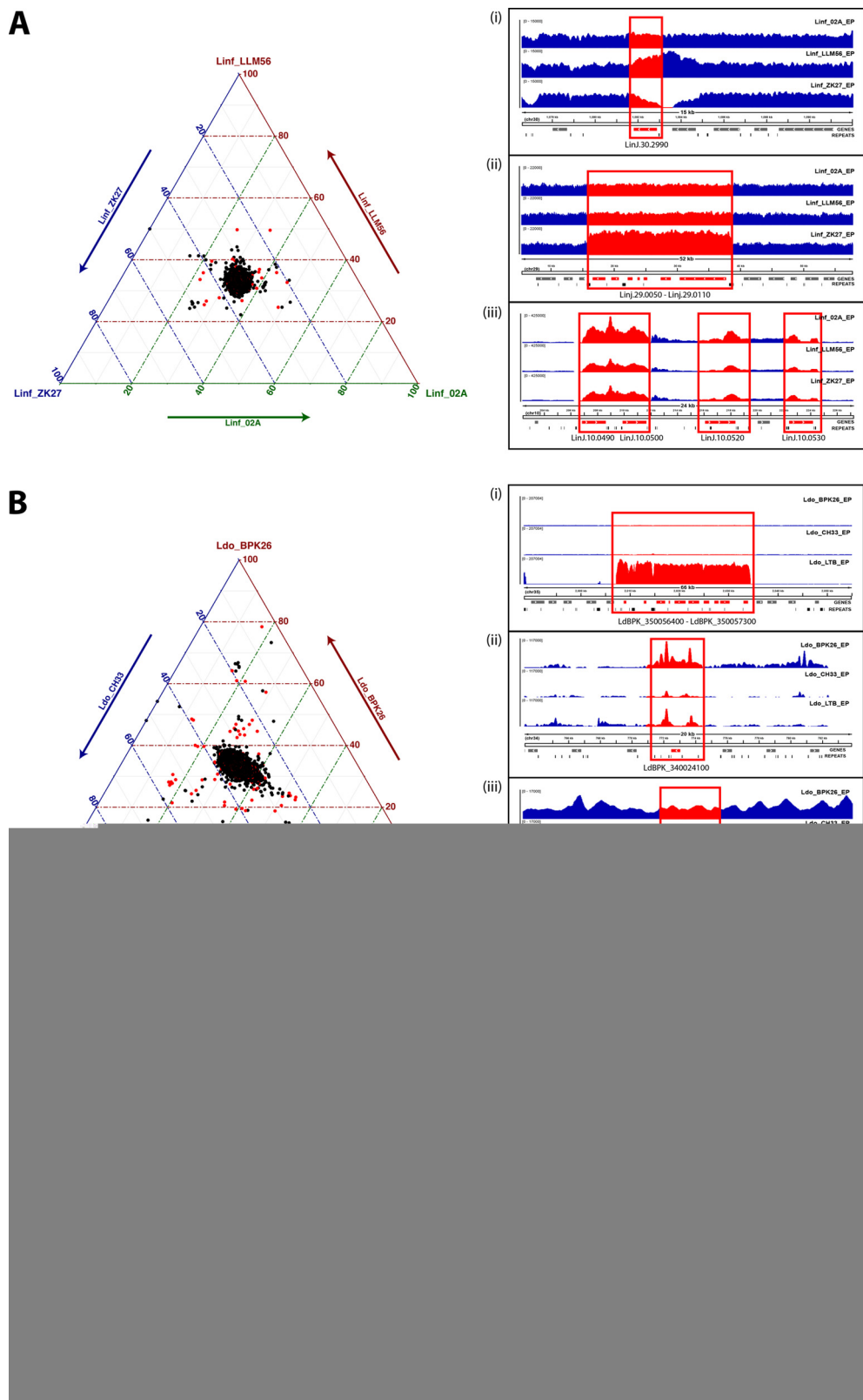
**Strain-specific gene copy number variations.** Cross-comparison of read depths among the EP samples revealed important intraspecies variations in copy number for single- and multicopy genes (see Materials and Methods and see Table S7 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]). Plotting the gene coverage values for the three *L. infantum* isolates, the three *L. donovani* isolates, or the two *L. major* isolates together with the *L. tropica* sample, resulted in strong, confined signals at the center of the ternary plots that correspond to genes with equal copy number and thus a 33% distribution across the three axes (Fig. 2, left panels). Compared to the different reference genomes, we observed important, strain-specific differences in gene copy number that are visualized on these plots by shifts of the signals out of the center.



**FIG. 1** SNVs and translocations with respect to the reference genomes. Venn diagrams show the number of unique and shared SNVs among three *L. infantum* strains (A), three *L. donovani* strains (B), and two *L. major* strains together with an *L. tropica* strain (C). (D) Circos representation of genomic translocations in samples Ldo\_CH33 and Ldo\_LTB compared to the corresponding *L. donovani* reference genome. Connecting lines represent translocations events. Black and red lines demonstrate, respectively, Ldo\_CH33 and Ldo\_LTB specific translocations. Blue lines show translocations common in both strains. No inversions were detected using the filtering settings indicated in the Materials and Methods section. Black, chromosomes; red, genes mapping on the positive strand; green, genes mapping on the negative-strand.

Overall, using a cutoff of a 0.5 increase or decrease in a normalized read depth of 1 (corresponding to the copy number per haploid genome), we observed 67, 152, and 119 strain-specific amplifications, respectively, for *L. infantum*, *L. donovani*, and *L. major* (see Table S8 at GitLab). A selection of annotated genes is shown in Table 1 and Table 2 (for the full panel, see Table S8), and prominent examples are represented in the right panels of Fig. 2.

In *L. infantum*, we observed (i) a 2.94-fold amplification in Linf\_LLM56 of LinJ.30.2990 encoding a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, (ii) a cluster of seven genes (Linj.29.0050 to Linj.29.0110) located in an ~23-kb region delimited by SIDER repetitive



**FIG. 2** Interstrain gene CNV. (A to C) Ternary plots showing for each gene the relative abundance in the three considered strains (left panels). The axes report the fraction of the normalized gene coverage in the three strains, with each given point adding up to 100. Black dots represent unique genes, whereas red dots indicate genes representing gene families. Comparisons of three *L. infantum* strains (A), three *L. donovani* strains (B), and two *L. major* strains together with an *L. tropica* strain (C) are shown. The right panels show examples of detected gene copy number variations (CNVs). From top to the bottom, the tracks represent the sequencing depth measured in the three strains,

(Continued on next page)

**TABLE 1** Selection of gene CNVs in *L. infantum* field isolates<sup>a</sup>

Gene_id <sup>b</sup>	Normalized mean read depth of:			Annotation
	LinJ_ZK27	LinJ_LLM56	LinJ_02A	
LinJ.08.0780	0.96	1.12	2.18	Amastin-like protein
LinJ.09.0200	5.72	9.86	8.1	Putative ATG8/AUT7/APG8/PAZ2
LinJ.10.0490*	18.1	20.55	32.92	GP63, leishmanolysin
LinJ.12.0661	11.63	13.46	6.1	Conserved hypothetical protein
LinJ.15.1240	1.96	3.82	3.87	Putative nucleoside transporter 1
LinJ.19.0820	9.58	14.39	9.09	Putative ATG8/AUT7/APG8/PAZ2
LinJ.23.1330	2.45	3.44	1.46	Hypothetical protein, unknown function
LinJ.26.snoRNA1	3.25	3.77	4.91	ncRNA <sup>c</sup>
LinJ.26.snoRNA15	4.2	4.74	6.21	ncRNA
LinJ.26.snoRNA2	3.59	4.34	5.51	ncRNA
LinJ.26.snoRNA3	3.92	4.67	6.04	ncRNA
LinJ.26.snoRNA4	4.03	5	6.28	ncRNA
LinJ.26.snoRNA5	3.94	4.94	6.2	ncRNA
LinJ.26.snoRNA6	4.41	5.04	6.61	ncRNA
LinJ.26.snoRNA7	4.64	5.18	6.9	ncRNA
LinJ.29.0060*	2.04	1.08	0.96	Putative tryptophanyl-tRNA synthetase
LinJ.29.0070*	2.17	1.02	1.01	QA-SNARE protein putative
LinJ.29.0080*	2.07	1.08	0.99	Conserved hypothetical protein
LinJ.29.0090*	2.09	1.03	1.05	Putative Ras-like small GTPases
LinJ.29.1610	1.89	4.45	1.81	Conserved hypothetical protein
LinJ.29.2570	3.2	2.41	1.92	Putative 60S ribosomal protein L13
LinJ.30.2990*	0.98	3.57	2.01	G3P dehydrogenase
LinJ.31.1470	1.98	1.96	1.17	Hypothetical protein, unknown function
LinJ.31.1930	10.41	16.79	15.38	Ubiquitin-fusion protein
LinJ.31.2390	1.04	1.04	0	Helicase-like protein
LinJ.33.0360	20.87	13.19	12.22	Heat shock protein 83-1
LinJ.34.1020	2.11	1.22	2.16	Putative amastin-like surface protein
LinJ.34.1680	4.07	6.09	3.99	Putative amastin-like surface protein
LinJ.36.0190	3.1	5.62	7.22	Elongation factor 2

<sup>a</sup>For full data, see Table S7 at GitLab ([https://gitlab.pasteur.fr/gbussotti/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussotti/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)).

<sup>b</sup>Asterisks indicate genes shown in the right panel of Fig. 2.

<sup>c</sup>ncRNA, noncoding RNA.

elements that showed a 2-fold amplification in Linf\_ZK27, and (iii) the amplification (up to 32-fold) of the GP63 leishmanolysin cluster (LinJ.10.0490 to LinJ.10.0530) in Linf\_02A. For *L. donovani*, we identified (i) a 48-fold amplification specific to Ldo\_LTB of a cluster of 10 genes (LdBPK\_350056400 to LdBPK\_350057300), which includes a bipterin transporter, an RNase P, an RNA pseudouridylate synthase, and a putative ribosomal L37e protein, (ii) an up to 26-fold amplification in Ldo\_BPK26 of a putative amastin surface glycoprotein (LdBPK\_340024100), and (iii) the deletion in Ldo\_CH33 and partial depletion in Ldo\_LTB of a putative amastin-like surface protein (LdBPK\_340015500). Finally, as expected from their phylogenetic relationship, important differences were observed in gene CNVs between the *L. tropica* and *L. major* strains, including (i) an amplification on chromosome 35 in both Lmj\_1948 and Lmj\_A445 (respectively, 3.51- and 2.63-fold), spanning a hypothetical protein (LmjF.35.0250) and the 5' portion of a putative GTPase-activating protein (LmjF.35.0260), (ii) an up to 6-fold amplification in Ltr\_16 of a putative KU80 protein (LmjF.30.0340) flanked by SIDER2 elements, and (iii) an Lmj\_A445-specific amplification of a small nucleolar RNA (snoRNA) cluster on chromosome 26.

Together these results suggest that gene CNVs may drive or be the result of adaptation of otherwise highly related *Leishmania* field isolates, causing phenotypic differences with respect to stress resistance, nutrition, and infectivity, as judged by

#### FIG Legend (Continued)

the gene annotations, and the predicted repetitive elements. Coverage tracks were produced with bamCoverage from the deepTools suite (48) (version 2.4.2), ignoring duplicated reads. Normalization of reads per kilobase per million (RPKM) was applied to render the coverage comparable across samples.

**TABLE 2** Selection of gene CNVs in *L. donovani* field isolates<sup>a</sup>

Gene_id <sup>b</sup>	Normalized mean read depth of:			Annotation
	Ldo_CH33	Ldo_BPK26	Ldo_LTB	
LdBPK_040006600	6.17	0.94	4.8	Hypothetical protein, conserved
LdBPK_050017700	14.07	12.32	9.35	snoRNA
LdBPK_080012500	10.68	9.38	7	Amastin-like protein
LdBPK_080013600	7.46	4.69	4.1	Amastin-like protein
LdBPK_080015900	7.21	10.48	6.93	Cathepsin L-like protease
LdBPK_090006900	8.63	4.22	9.44	Putative ATG8/AUT7/APG8/PAZ2
LdBPK_100009300	4.49	15.24	5.36	Folate/biopterin transporter, putative
LdBPK_120013500	10.18	7.52	18.83	Surface antigen protein 2, putative
LdBPK_120014600	18.73	8.8	15.23	Hypothetical protein
LdBPK_190014300	11.45	7.24	13.77	Putative ATG8/AUT7/APG8/PAZ2
LdBPK_270021500	2.11	4.16	3.06	Amino acid transporter, putative
LdBPK_270026500	3.24	1.13	5.69	Amino acid aminotransferase, putative
LdBPK_270030100	21.94	10.67	6.68	18S, ribosomal, SSU, RNA
LdBPK_270030130	20.81	10.7	6.4	rRNA
LdBPK_270030140	21.2	10.73	6.74	28S, ribosomal, RNA, LSU- $\alpha$
LdBPK_270030150	19.96	9.97	6.18	28S, ribosomal, RNA, LSU- $\beta$
LdBPK_270030160	17.77	9.65	5.93	28S, ribosomal, RNA, LSU- $\delta$ , M2
LdBPK_270030170	21.2	10.74	6.19	28S, ribosomal, RNA, LSU- $\zeta$ , M6
LdBPK_270030180	17.68	10.16	5.37	28S, ribosomal, RNA, LSU- $\epsilon$ , M4
LdBPK_280010700	3.08	1.01	2.48	Major surface protease gp63, putative
LdBPK_280035000	8.59	14.66	8.04	Heat shock protein hsp70, putative
LdBPK_300020900	2.34	7.56	1.88	p1/s1 nuclease
LdBPK_310009700	7.22	10.63	6.01	Amastin, putative
LdBPK_310016700	4.3	8.48	5.34	Sodium stibogluconate resistance protein
LdBPK_320043700	3.28	2.02	5.44	HIBCH-like protein
LdBPK_330008700	8.56	13.64	7.76	Heat shock protein 83-17
LdBPK_340015500*	0.07	1.18	0.36	Amastin-like surface protein, putative
LdBPK_340015600	3.19	5.12	3.15	Amastin-like surface protein, putative
LdBPK_340015800	1.78	0.92	3.36	Amastin-like surface protein, putative
LdBPK_340017400	2.75	1.04	0.8	Amastin-like surface protein, putative
LdBPK_340023500	3.03	1.87	9.92	Amastin-like surface protein, putative
LdBPK_340024100*	1.47	26.05	5.71	Amastin surface glycoprotein, putative
LdBPK_350056400*	1	1	48.78	Hypothetical protein
LdBPK_350056500*	1.02	1.07	47.88	Hypothetical protein, conserved
LdBPK_350056600*	1.04	0.98	44.76	Protein-only RNase P, putative
LdBPK_350056700*	1.22	1.1	36.57	Ribosomal protein L37e, putative
LdBPK_350056800*	1.03	1.03	43.11	RNA pseudouridylate synthase, putative
LdBPK_350056900*	1.01	0.91	45.34	Hypothetical protein
LdBPK_350057000*	0.92	0.96	41.41	Hypothetical protein
LdBPK_350057100*	1.05	0.87	42.65	Hypothetical protein, unknown function
LdBPK_350057200*	0.97	0.96	43.22	Biopterin transporter, putative
LdBPK_350057300*	1.06	0.89	44	Hypothetical protein

<sup>a</sup>For full data, see Table S7 at GitLab ([https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)). PacBio *L. donovani* LDBPK assembly and annotations were downloaded on 02/05/2017 (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Leishmania/donovani/LdBPKPAC2016beta>).

<sup>b</sup>Asterisks indicate genes shown in the right panel of Fig. 2.

gene CNVs observed in heat shock proteins, transporters, and known virulence factors (Table 1 and Table 2). Thus, gene CNV seems to shape the parasite genome and likely its pathogenic potential in the field through positive (amplification) and purifying (deletion) selection, potentially driving long-term adaptation to ecological constraints of local transmission cycles.

**Dynamic karyotype changes during extended growth in culture.** We next assessed structural genomic variations that may drive short-term environmental adaptation comparing EP and EP + 3 samples that evolved *in vitro* during culture adaptation. Whole-genome sequencing (WGS) and read depth analysis revealed important karyotype differences between the two *in vitro* passages of a given strain (intrastrain variation) and among different strains (interstrain variation). Aside from an intrachromosomal duplication at both EP and EP + 3 observed in Ldo\_LTB spanning nearly half of chromosome 27 (453,410 bases) affecting 113 genes, changes in read depth were homogenous across all chromosomes, thus revealing frequent aneuploidy (see Fig. S3

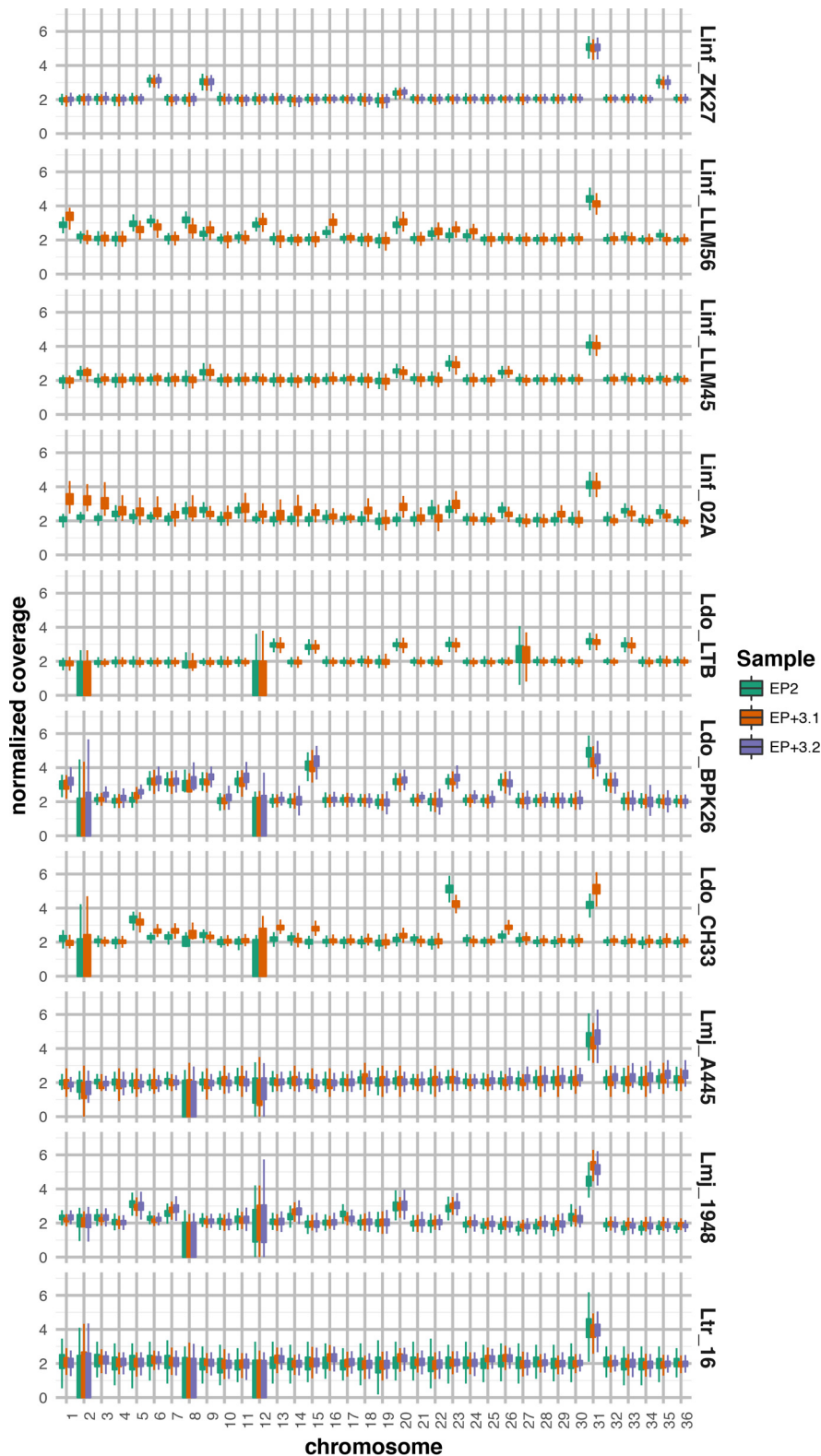
in the supplemental material). Linf\_ZK27 and Ldo\_LTB displayed the most stable karyotypes between EP and EP + 3. As judged by read depth values corresponding to integer or intermediate chromosome copy number values, full or mosaic aneuploidy was observed for four chromosomes in Linf\_ZK27 (chromosomes 6, 9, 31, and 35) and six chromosomes in Ldo\_LTB (chromosomes 13, 15, 20, 23, 31, and 33), which were established at EP and maintained at EP + 3 (Fig. 3; see Table S4 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]). All other isolates showed higher intrastrain karyotype instability with both gain and loss of chromosomes observed between EP and EP + 3. Linf\_02A represented the most extreme example showing significant changes in read depth for 21 chromosomes (Fig. 3; see Table S4 at GitLab) and five chromosomes with a somy score difference higher than 0.5 compared to the disomic state corresponding to 2 (see Material and Methods and see Table S4 at GitLab). Overall, chromosomes 20 and 23 showed the highest propensity for amplification between EP and EP + 3, with different ploidy levels (mosaic aneuploidy, trisomy, and tetrasomy) observed in, respectively, 19 and 15 samples out of 25, suggesting that amplification of these chromosomes may provide fitness advantage during culture adaptation for most of the strains analyzed in our study.

With the exception of the previously reported stable aneuploidy for chromosome 31 (10), the dynamics of the observed karyotypic changes are substantially different among all isolates. It is interesting to speculate that this heterogeneity reflects individualized solutions driving fitness gains *in vitro*. While differences in culture conditions certainly account for some of the observed karyotypic variability, the comparison of two closely related Spanish *L. infantum* isolates, Linf\_LLM45 and Linf\_LLM56, reveals a culture-independent component implicated in genomic adaptation. Both isolates were adapted to culture at the same time under the same conditions, yet they showed important differences in karyotype dynamics, with only Linf\_LLM56 demonstrating changes in somy levels at EP + 3 (Fig. 3; see Table S4 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]). These strains are genotypically identical (zymodeme MON-1) (see Table S1 at GitLab) and are genetically closely related, with an average nucleotide identity of over 99.95%, suggesting that minor genetic differences may have an important impact on *Leishmania* karyotypic adaptation to a given environment. Aside from SNVs (Fig. 1), the difference in karyotype dynamics may be linked to gene CNVs observed between Linf\_LLM45 and Linf\_LLM56, which affected genes implicated, for example, in protein translation, protein folding, or protein turnover (Table 3).

Despite this remarkable plasticity of the *Leishmania* karyotype, we observed that changes in chromosome number are highly reproducible in duplicate EP + 3 samples that were derived for *L. major* (Lmj\_1948 and Lmj\_A445), *L. infantum* (Linf\_ZK27), *L. donovani* (Ldo\_BPK26), and *L. tropica* (Ltr\_16) (Fig. 3). Thus, even though karyotypic fluctuations may arise in a stochastic manner—either in the host or during culture adaptation—our data demonstrate that beneficial karyotypes are under strong selection during culture adaptation. Significantly, the SNV frequency profiles for EP and EP + 3 were largely identical, ruling out the possibility that adaptation occurs through selection of subpopulations that would cause important shifts in SNV frequency distribution (data not shown). Together our results document the highly dynamic nature of karyotype management in *Leishmania* during environmental adaptation that is likely governed by complex interactions between external cues and intrinsic genetic differences.

#### **Dynamic variations in gene copy number during *de novo* culture adaptation.**

Plotting of genome-wide sequencing coverage of EP + 3 against EP for all annotated genes resulted in a largely diagonal distribution, suggesting that there are no major CNVs between the two different passages (Fig. 4A; see Fig. S4 in the supplemental material and see Table S9 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]). Overall, the majority of genes were scattered around a normalized coverage of 1 (corresponding



**FIG. 3** Chromosome ploidy analysis. Box plots represent the normalized sequencing coverage distributions for each chromosome for the strains indicated. The lower and upper edges of the box show, respectively, the lower quartile (i.e., 25% of nucleotides with normalized coverage below that value) and upper quartile (i.e., 25% of nucleotides with normalized coverage above that value). The whiskers show maximum and minimum coverage values, excluding outliers. Outliers are not shown to ease plot readability. Box sizes reflect coverage dispersion that can be affected by sample sequencing depth, chromosomal ploidy, intrachromosomal copy number alterations, assembly gaps, or repetitive regions.

(Continued on next page)

Downloaded from <http://mbio.asm.org/> on November 6, 2018 by guest

**TABLE 3** Gene CNVs in the Spanish *L. infantum* isolates Linf\_LLM45 and Linf\_LLM56

Gene	Normalized mean read depth of:		Ratio	Delta	Annotation
	Linf_LLM45	Linf_LLM56			
LinJ.02.0690	1.6	2.1	0.7	0.5	Hypothetical protein, unknown function
LinJ.03.0420	1.4	1.9	0.7	0.6	Putative 60S acidic ribosomal protein P2
LinJ.04.0160	1.4	2.0	0.7	0.6	Hypothetical protein
LinJ.04.0180	2.2	1.1	2.0	1.1	Surface antigen-like protein
LinJ.05.snoRNA3	7.9	8.4	0.9	0.6	ncRNA <sup>a</sup>
LinJ.05.snoRNA5	7.7	8.8	0.9	1.1	ncRNA
LinJ.09.0200	8.8	7.8	1.1	1.0	ATG8/AUT7/APG8/PAZ2, cytoskeleton
LinJ.10.0490	15.4	16.7	0.9	1.3	GP63, leishmanolysin
LinJ.11.1110	3.3	1.9	1.7	1.4	Putative 60S ribosomal protein L28
LinJ.11.1120	2.1	1.0	2.1	1.1	Conserved hypothetical protein
LinJ.13.0330	11.3	10.0	1.1	1.3	$\alpha$ -Tubulin
LinJ.14.0400	1.8	3.8	0.5	2.0	Conserved hypothetical protein
LinJ.15.snoRNA4	15.3	13.8	1.1	1.5	ncRNA
LinJ.17.0090	21.1	21.8	1.0	0.8	Elongation factor 1- $\alpha$
LinJ.18.1500	4.0	3.1	1.3	0.9	Putative P-type H <sup>+</sup> -ATPase
LinJ.19.0820	9.9	11.3	0.9	1.4	Putative ATG8/AUT7/APG8/PAZ2
LinJ.19.1350	2.7	3.8	0.7	1.0	Putative glycerol uptake protein
LinJ.22.snoRNA1	5.7	4.7	1.2	1.0	ncRNA
LinJ.26.snoRNA10	5.4	4.9	1.1	0.5	ncRNA
LinJ.26.snoRNA15	5.4	4.7	1.1	0.6	ncRNA
LinJ.26.snoRNA7	5.8	5.2	1.1	0.7	ncRNA
LinJ.29.1570	1.0	1.6	0.7	0.5	Conserved hypothetical protein
LinJ.29.1580	1.0	1.5	0.7	0.5	Conserved hypothetical protein
LinJ.29.1610	2.8	3.7	0.8	0.9	Conserved hypothetical protein
LinJ.29.2240	1.2	1.8	0.6	0.6	Conserved hypothetical protein
LinJ.30.0690	3.6	3.0	1.2	0.6	Putative 40S ribosomal protein S30
LinJ.30.1660	2.0	1.4	1.4	0.6	Conserved hypothetical protein
LinJ.30.3550	1.0	2.0	0.5	1.0	Conserved hypothetical protein
LinJ.30.3560	1.0	2.0	0.5	1.0	S-Adenosylmethionine synthetase
LinJ.31.0460	3.0	1.0	2.9	2.0	Putative amastin
LinJ.31.1660	2.9	2.1	1.4	0.8	3-Ketoacyl-CoA thiolase-like protein
LinJ.31.1930	16.1	13.4	1.2	2.7	Ubiquitin-fusion protein
LinJ.32.1910	2.8	1.8	1.6	1.0	Putative iron superoxide dismutase
LinJ.33.0360	5.8	11.3	0.5	5.6	Heat shock protein 83-1
LinJ.34.1010	5.4	3.8	1.4	1.6	Putative amastin-like surface protein
LinJ.34.1020	3.1	1.2	2.6	1.9	Putative amastin-like surface protein
LinJ.34.1680	4.1	6.1	0.7	2.0	Putative amastin-like surface protein
LinJ.34.1730	10.9	14.4	0.8	3.5	Putative amastin-like surface protein
LinJ.36.0190	6.0	5.0	1.2	1.0	Elongation factor 2
LinJ.36.1680	1.8	2.5	0.7	0.6	Universal minicircle sequence bd. protein
LinJ.36.3010	1.5	2.3	0.7	0.8	40S ribosomal protein S24e

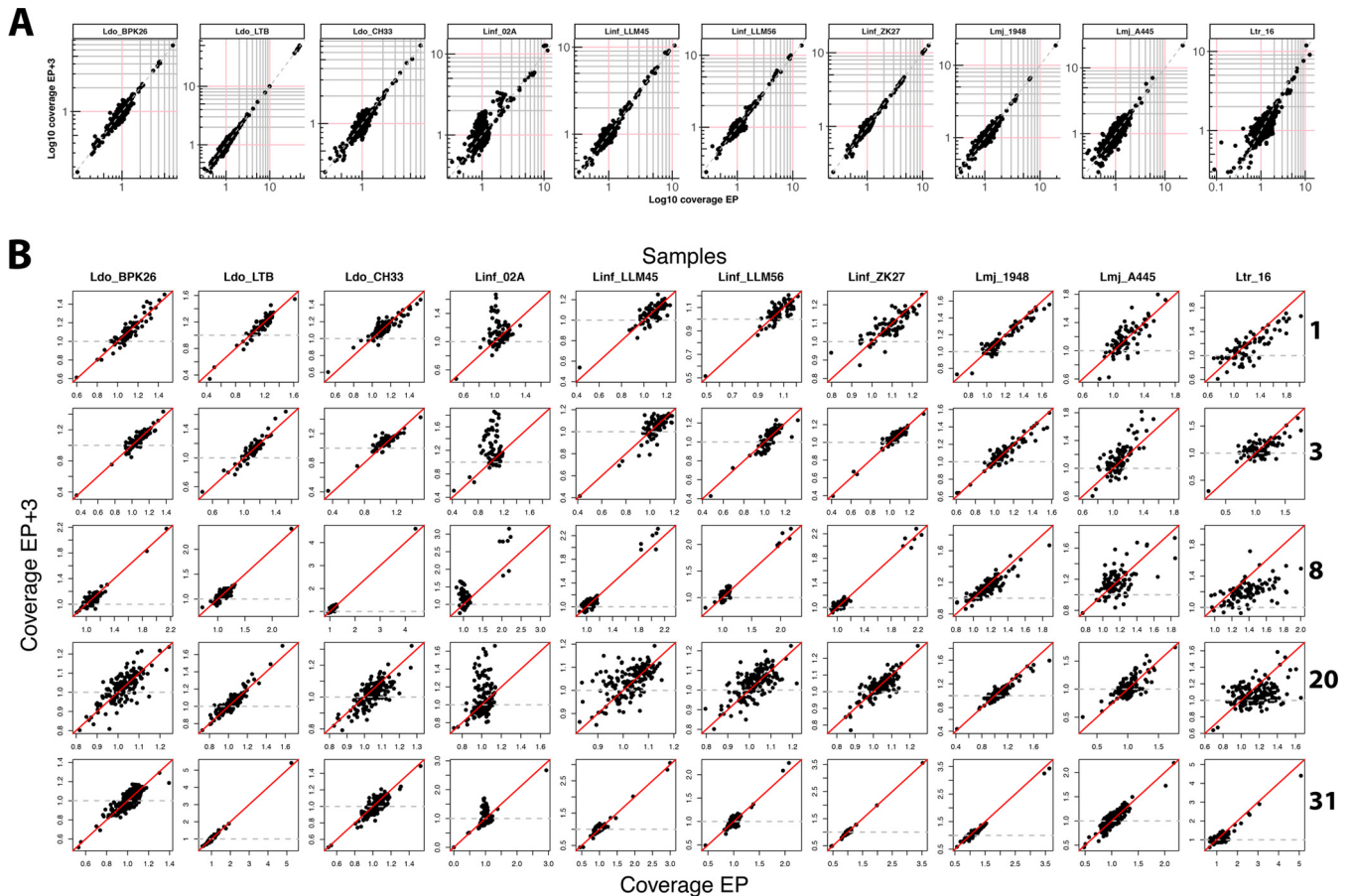
<sup>a</sup>ncRNA, noncoding RNA.

to the copy number per haploid genome [see Materials and Methods]), suggesting that their copy number matches the one in the reference strains. We nevertheless observed a significant number of genes across all isolates that showed coverage either below 0.5-fold or above 2-fold, independent of culture passage, thus, revealing important differences between the isolates and their corresponding reference genomes. This analysis uncovered a significant increase in coverage at EP + 3 for all chromosomes of strain Linf\_02A (Fig. 4B; see Table S9 at GitLab), indicating some form of CNV that correlated with increased culture passage. In the following analyses, we more closely investigated the structural basis of these culture-associated CNVs in Linf\_02A.

**Telomeric amplification.** We partitioned the genome into contiguous windows and plotted the coverage at EP or EP + 3, as well as the ratio between EP + 3 and EP. We

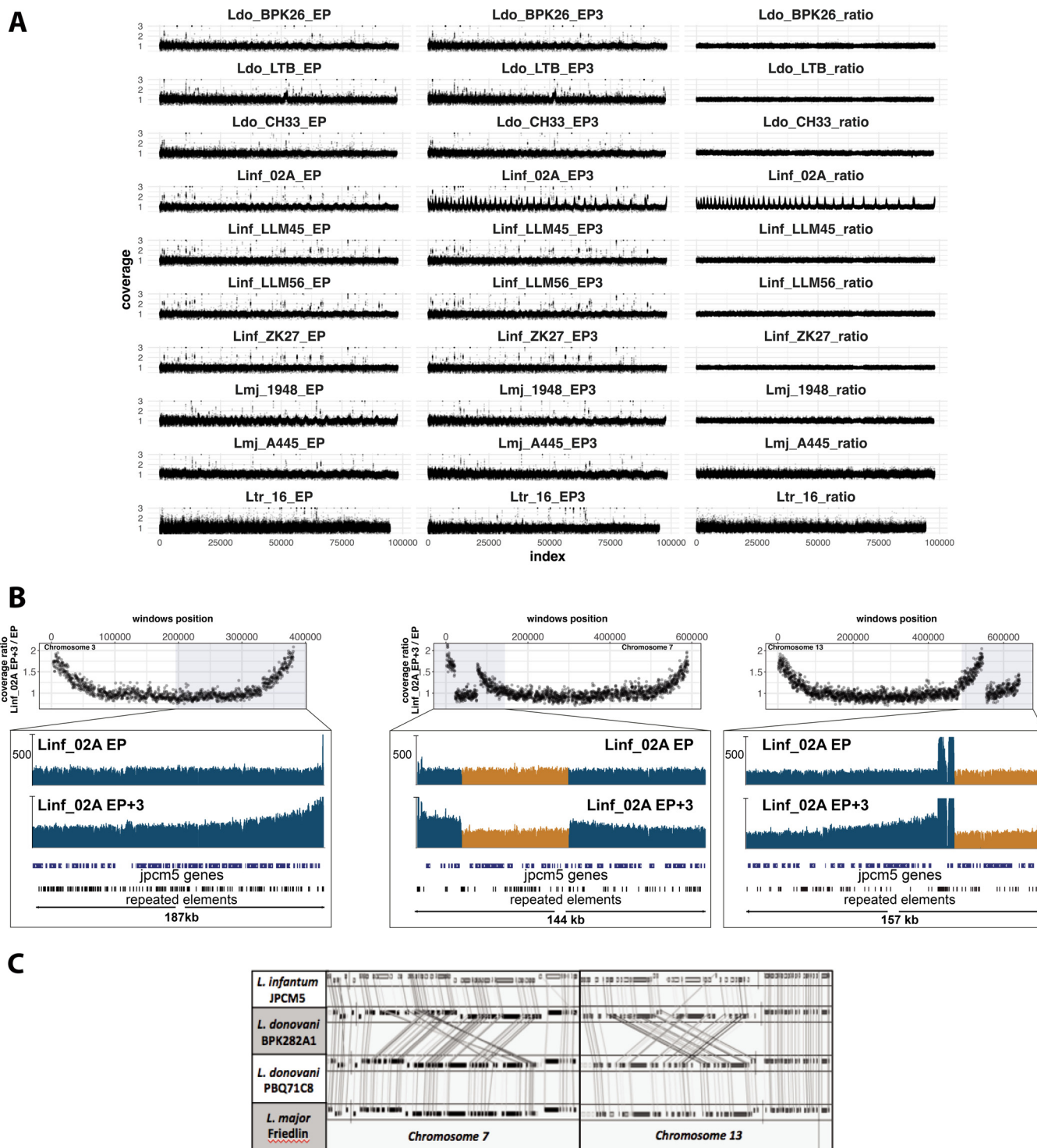
**FIG Legend (Continued)**

The increased box size visible in chromosome 27 of sample Ldo\_LTB is caused by a large subchromosomal amplification (Fig. S3). In *L. donovani*, *L. major*, or *L. tropica* samples, the presence of large gaps or repetitive regions inflates the box size for chromosomes 2, 8, and 12. Green, early passage (EP); orange, EP + 3.1 replicate; purple, EP + 3.2 replicate.



**FIG. 4** Gene copy number variation (CNV) during culture adaptation. (A) Genome-wide scatter plot showing  $\log_{10}$  gene coverage of EP and EP + 3 samples. Dots represent all genes annotated in the respective reference assemblies. (B) Chromosome-specific scatter plots of gene CNVs between EP + 3 versus EP. Only selected chromosomes are shown, and the full panel is available in Fig. S4. The red diagonal lines indicate the bisectors. The gray dashed horizontal lines mark a coverage value of 1. The axes' maximum and minimum values were adjusted to the most extreme values for each plot to avoid logarithmic compression. For both panels A and B, the EP + 3.1 replicate was used, except for Lmj\_A445, for which the EP + 3.2 replicate was utilized.

observed a significant increase in read depth toward the telomeres in both EP and EP + 3 for Lmj\_1948, while coverage fluctuations in EP + 3 were observed for Ltr\_16, Lmj\_A445, and Linf\_02A, generating a repetitive pattern when plotting the entire genome (Fig. 5A). The observed increase in read depth is not discrete but gradual, spanning from subtelomeric regions to the telomeres and thus cannot be assigned to misannotation of the number of telomeric repeats in the reference genome. (That should cause a discrete but not progressive increase in read depth at the telomeres only.) The gradual increase in read depth supports the increased gene coverage and contributes to the shift in the chromosome coverage distribution we observed for strain Linf\_02A at EP + 3 (Fig. 3 and Fig. 4B). We found the gradual increase in read depth to be disrupted for chromosomes 7 and 13 by regions with lower read depth (Fig. 5B; see Fig. S5 in the supplemental material). According to our model, these genomic elements should not be part of subtelomeric regions and thus either reflect a strain-specific recombination event or misassembly of the *L. infantum* reference genome. Synteny analysis among available reference genomes showed that the disruptive sequence elements observed in Linf\_02A show subtelomeric localization in *L. major* and the novel PacBio-generated LdBPK genome (12), revealing misassembly of these regions in the current *L. infantum* and the previous *L. donovani* reference genomes (Fig. 5C). This "diagnostic" value of our result confirms that telomeric amplification is not a technical artifact but represents a nonconventional mechanism of telomeric amplification in *Leishmania* that may be similar to those described in other organisms (21).



**FIG. 5** Subtelomeric amplification. (A) Genome-wide coverage ratios (y axes) between EP and EP + 3 of the indicated samples and their respective reference genomes (left and middle panels) or between EP + 3/EP (right panels) are shown. The EP + 3 coverage refers to the EP + 3.1 replicate, except for Lmj\_A445, for which EP + 3.2 replicate coverage was used. The x axis reports the position of the genomic windows along the chromosomes. Dots represent genomic windows of 300 bases. In each panel, the 36 *Leishmania* chromosomes are shown in sequential order. To ease the visualization, all scores of >3 were assigned to a value of 3. (B) The EP + 3/EP coverage ratio for chromosomes 3, 7, and 13 of sample Linf\_02A (top panel) and the Integrative Genomics Viewer (IGV) snapshots of the respective chromosome extremities (bottom panel) are shown. The lower tracks (in order of appearance from the top) correspond to sequencing coverage in EP, sequencing coverage in EP + 3, repeat elements, or predicted low-complexity region predictions and *L. infantum* gene annotations. The sequencing coverage tracks range from 0 to 500 $\times$ . For chromosomes 7 and 13, the bottom panels highlight in orange the misassembled regions. (C) SyntView snapshot of chromosomes 7 and 13. From top to bottom, the tracks show the orthologous genes in *L. infantum* JPCM5, *L. donovani* BPK282A1, *L. donovani* PBQ71C8, and *L. major* Friedlin. Straight lines connect the orthologous genes in different genomes. The diagonal lines are indicative of misassembled genomic regions.

## DISCUSSION

Drawing from newly generated genome sequences of *Leishmania* clinical isolates and conducting longitudinal studies *in vitro*, we demonstrate the existence of strain-specific gene copy number variations that may drive long-term and short-term evolutionary trajectories in *Leishmania*. We show that highly related *Leishmania* isolates that evolved in different regions are distinguished by both amplification and loss of genes linked to parasite infectivity, such as GP63 or amastins. The fixation of these genetic alterations may not be random but could potentially be the result of positive or purifying selection processes that are functional and adapt parasite fitness to a given ecology or transmission cycle. Identification of such genomic alterations that are under selection by the host can directly inform about genetic loci that are clinically relevant. The corresponding genes may be prioritized for functional genetic analysis (notably those genes that are not annotated) as they may play important roles in virulence and may qualify as biomarkers with diagnostic or prognostic value.

Monitoring of genetic fluctuations using *de novo* culture as a proxy for short-term environmental adaptation revealed two forms of dynamic genomic changes. First, as judged by the establishment of reproducible aneuploidy profiles in duplicate cultures of a given strain, chromosomal amplification is the result of selection rather than random genetic drift. This result corroborates our previous observations in the *L. donovani* experimental strain LD15, where spontaneous karyotypic fluctuations generate genotypically and phenotypically diverse mosaic populations that are substrates for evolutionary adaptation and fitness gain in response to environmental change (13). Whether chromosomal amplification occurs *de novo* during culture adaptation or reflects an initial diversity in each clinical isolate remains to be established, even though the karyotype mosaicism we previously observed *in situ* in *L. donovani*-infected hamster spleen and liver favors the latter explanation (13).

Second, we uncovered a novel mechanism of telomeric amplification in three different *Leishmania* species (*L. major*, *L. tropica*, and *L. infantum*), as revealed by a progressive increase in sequencing read depth toward the chromosome ends. Non-classical mechanisms of telomere maintenance have been documented in a variety of eukaryotes, including (i) rolling circle replication in *Kluyveromyces lactis*, implicating extrachromosomal circular templates (22), (ii) break-induced replication in *Saccharomyces cerevisiae* involving recombination between tracts of telomeric repeats (23), or (iii) the telomeric loop formation first observed in human and mouse cells, in which a telomere 3' end loops back to invade the duplex part of the same telomere and anneals with complementary telomeric repeat sequence (21). Our observation of a gradual increase in read depth from large subtelomeric regions toward the chromosome ends is compatible with rolling circle replication, considering the propensity of *Leishmania* to extrachromosomal amplification (9), the absence of telomeric repeats in subtelomeric regions in Linf\_02A that would allow for telomeric loop formation (data not shown), and the presence of only very small telomeric loops of less than 1 kb in the related pathogen *Trypanosoma brucei* (24). Given that bona fide amastigotes cannot be maintained or adapted to culture, our *in vitro* evolutionary experiments were conducted with insect-stage promastigotes that were directly derived from tissue-derived amastigotes. Thus, the various forms of genomic instability we observed in our system likely drive adaptation and fitness gain in the sand fly vector. While we previously documented the prevalence of chromosomal amplification in tissue amastigotes (13), the presence of telomeric amplification at this stage remains to be established.

Our comparative genomics approach further provided a powerful tool to reveal species- and strain-specific variations in genomic adaptation. Telomeric amplification was only seen in 3 of the 10 isolates, and very different karyotypic solutions were observed even in closely related isolates under the same culture conditions, revealing the significance of environment-independent, intrinsic factors in genomic adaptation. Using the highly related Spanish isolates Linf\_LLM56 and Linf\_LLM45 as an example, various genetic determinants may be implicated. Both strains were obtained from the

same area in a short time frame, suggesting a very recent common ancestor, as confirmed by their genetic similarity. Nevertheless, they were isolated from two stray dogs, and genetic differences of both mammalian and insect hosts during natural infection may have shaped the parasite genomes in different ways through genotype-genotype interactions, as observed, for example, in anopheline mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum*, the causal agent of malaria (25). Given the intrinsic instability of the *Leishmania* karyotype we observed *in situ* during visceral infection in liver- and spleen-derived amastigotes (13), these interactions may establish a very different chromosomal stoichiometry among canine isolates, which then translates into the different karyotypic trajectories we observed during culture adaptation. Likewise, differences in the number of single-copy genes or CNVs in multicopy gene arrays generated by intra- or extrachromosomal amplification (9) may impact the karyotypic profile, with gene amplification alleviating the need for chromosome duplication as previously suggested (10). Finally, we cannot rule out that individual SNVs in coding sequences or regulatory element 5' and 3' untranslated regions (UTRs) may have an impact on genomic adaptation, a possibility that is supported by our previous observation of tissue-specific haplotype selection in the liver and spleen of *L. donovani*-infected hamsters (13).

In conclusion, our results draw a complex picture of *Leishmania* genomic adaptation in the field and in culture that needs to be considered in epidemiological studies that correlate parasite phenotypic variability and disease outcome. Adaptation is highly individualized and results from a dynamic selection process acting on genetically heterogeneous parasite populations that thrive inside distinct and genetically equally heterogeneous hosts (e.g., insects, rodents, and humans). For environmental adaptation, *Leishmania* can draw from a vast genetic landscape of spontaneous karyotypic fluctuations, stochastic gene amplifications, and nucleotide polymorphisms. Our comparison of highly related Spanish *L. infantum* isolates revealed that even small variations in sequence might result in important differences in karyotypic adaptation. Thus, closely related isolates evolving in the same epidemiological niche can attain similar levels of fitness in a highly pleiotropic way using alternative genetic solutions (13). This form of pleiotropic adaptation is characteristic for pathogenic microbes that maintain genetic heterogeneity, and thus evolvability, despite strong selection. Our data indicate that *Leishmania* adopts a similar, polyclonal adaptation strategy, which may strongly limit the identification of biomarkers with broad clinical relevance across *Leishmania* species or even related *Leishmania* strains. Future efforts need to take this complexity into account and approach the epidemiology of *Leishmania* infection on an integrative level, considering genotype-genotype and environment-genotype interactions and dissecting the population structure of individual isolates by single-cell, direct tissue sequencing.

## MATERIALS AND METHODS

**Leishmania parasite isolation and culture.** Ten *Leishmania* strains belonging to the *L. tropica*, *L. major*, and *L. donovani* complexes of eight different geographical areas were isolated from infected patients, dogs, or hamsters (see Table S1 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussotti/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussotti/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]). Some strains were cryopreserved in liquid nitrogen prior to culture adaptation until used for this study (see Table S1 at GitLab). *Leishmania* isolates were first stabilized *in vitro* in media that were optimized in the various Leishield partner laboratories (stabilization medium; see Table S2 at GitLab), prior to expansion in classical RPMI culture medium for a defined number of passages (expansion medium). Seven strains belonging to the *L. donovani* complex were selected for the comparison of intraspecies evolvability in culture. These include the four *L. infantum* strains Linf\_ZK27 from Tunisia, Linf\_LLM56 and Linf\_LLM45 from Spain, and Lin\_02A from Brazil (voucher to assess this sample at Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz [CLIOC]: IOCL3598), as well as the three *L. donovani* strains Ldo\_BPK26 from India, Ldo\_LTB from Sudan, and Ldo\_CH33 from Cyprus. The latter strain belongs to the *L. donovani* MON-37 zymodeme (17–19), and multilocus microsatellite typing (MLMT) analysis has positioned it in a novel *L. donovani sensu lato* (s.l.) group (26). Our analysis further included two *L. major* strains (Lmj\_1948 from Tunisia, Lmj\_A445 from Algeria) and one *L. tropica* strain (Ltr\_16 from Morocco) (see Table S1 at GitLab). Genotyping methodologies were applied to confirm species identity of the strains used in this work (see Table S1 at GitLab). Standardized procedures for DNA sample preparation and cell culturing or subculturing were used in all partner laboratories (see Table S2 at GitLab). Promastigotes from early cell culture

(passage 2 of growth in expansion medium, referred to as early passage [EP] samples) and derived parasites maintained in culture for three more *in vitro* passages (EP + 3) were processed for whole-genome sequencing (WGS) using parasites from the late logarithmic growth phase. While different *Leishmania* strains can show differences in terms of generation time and can reach different population densities, we previously estimated that a single passage in culture corresponds to ca. 10 generations (13). To determine reproducibility of *in vitro* genome evolution, duplicate EP + 3 samples (EP + 3.1 and EP + 3.2) were generated for the Linf\_ZK27, Lmj\_1948, Lmj\_A445, Ldo\_BPK26, and Ltr\_16 strains (Fig. S1). Culture conditions and time in culture for the 25 samples are detailed in Table S2 at GitLab.

**Nucleic acid extraction, sample preparation, and sequencing analysis.** Procedures for DNA sample preparation and quality control were standardized using common protocols. Briefly, DNA extraction was performed using DNeasy blood and tissue kits from Qiagen according to the manufacturer's instructions. Nucleic acid concentrations were measured with Qubit, and the DNA quality was evaluated on agarose gel. Between 2 and 5  $\mu\text{g}$  of DNA was used for sequencing. The following samples showed small DNA amounts and were thus PCR amplified before sequencing: Ldo\_LTB\_EP (5 cycles), Ldo\_LTB\_EP + 3 (5 cycles), Linf\_02A\_EP (10 cycles), Linf\_02A\_EP + 3 (5 cycles). No PCR amplification was performed for the other samples.

Whole-genome, short-insert, paired-end libraries were prepared for each sample. Samples Ltr\_16\_EP, Ltr\_16\_EP + 3.1, Ltr\_16\_EP + 3.2, Ldo\_BPK26\_EP, Ldo\_BPK26\_EP + 3.1, Ldo\_BPK26\_EP + 3.2, Lmj\_A445\_EP, Lmj\_A445\_EP + 3.1, and Lmj\_A445\_EP + 3.2 were sequenced by the Biomics sequencing platform (<https://research.pasteur.fr/en/team/biomics/>) with HiSeq 2,500 rapid runs, resulting in  $2 \times 108$ -bp reads using the NEXTflex PCR-Free kit. All other samples were sequenced with the KAPA Hyper Prep kit (Kapa Biosystems) at Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG [<http://www.cnag.crg.eu/>]) using the TruSeq SBS kit v3-HS (Illumina, Inc.). Multiplex sequencing was performed according to standard Illumina procedures, using HiSeq2000 flowcell v3, generating  $2 \times 101$ -bp paired-end reads.

**Read alignment.** Gene annotations and reference genomes of *L. major* Friedlin and *L. infantum* JPCM5 were downloaded from the Sanger FTP server (27). (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/gff3/CURRENT/>) on 5 September 2017, whereas PacBio *L. donovani* LDBPK assembly and annotations were downloaded on 5 February 2017 (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Leishmania/donovani/LdBPKPAC2016beta>). The reads were aligned to the reference genomes with BWA mem (version 0.7.12) (28, 29) with the flag -M to mark shorter split hits as secondary. Samtools fixmate, sort, and index (version 1.3) (30) were used to process the alignment files and turn them into bam format. RealignerTargetCreator and IndelRealigner from the GATK suite (31–33) were run to homogenize indels. Eventually, PCR and optical duplicates were labeled with Picard MarkDuplicates [version 1.94(1484)] (<https://broadinstitute.github.io/picard/>) using the option "VALIDATION\_STRINGENCY=LENIENT." While the reads were aligned against full assemblies, including unsorted contigs, just the canonical 36 chromosomes were considered for downstream analyses of ploidy estimation and copy number alterations. This filter was necessary because of the high content of repetitive elements and the absence of comparable and high-quality annotations in the contigs. Given that the *L. tropica* reference genome is still unfinished, the sample Ltr\_16 was aligned against the *L. major* Friedlin genome. Overall, starting from a total of 1,011,803,806 short reads, 952,093,114 were successfully aligned to the respective reference genomes (see Table S3 at GitLab [[https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)]). Picard CollectAlignmentSummaryMetrics was used to estimate sequencing and mapping statistics.

**Comparative genome analysis.** Whole-genome sequencing data from the EP *Leishmania* isolates were processed with Trimmomatic (version 0.35) (34) to remove low-quality bases (options "LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15") and adapter contaminations (option "ILLUMINACLIP," with values 2:30:12:1:true). Reads that were shorter than 36 bases after filtering were discarded (option "MINLEN:36"). The trimmed reads were assembled with SPAdes (35) (version 3.7.0) with the option "careful." The resulting contigs were used to estimate the average nucleotide identity (ANI) with the dnadiff part of the MUMmer system (version 3.23) (36). The analysis included the reference genomes of *L. donovani*, *L. infantum*, and *L. major* that were retrieved from the Sanger database (described above) and reference genomes of *L. braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. panamensis* that were retrieved from ENSEMBL Protists release 29 (37). The ANI values were converted to a matrix of distances, which in turn were used for principal-component analysis (PCA) and hierarchical clustering (R hclust function [<https://www.r-project.org/>]).

**Chromosome sequencing coverage.** For each read alignment file, Samtools view (version 1.3) and BEDTools genomecov (version 2.25.0) (38) were used to measure the sequencing depth of each nucleotide. Samtools was run with options "-q 50 -F 1028" to discard reads with a low map quality score or potential duplicates, while BEDTools genomecov was run with options "-d -split." Nucleotide coverage was normalized by the median genomic coverage.

The chromosome sequencing coverage was used to evaluate aneuploidy between EP and EP + 3 samples. For each sample and for each chromosome, the median sequencing coverage was computed for contiguous windows of 2,500 bases. For those strains for which two EP + 3 samples were available, the mean of EP + 3.1 and EP + 3.2 was used to calculate the statistical significance of amplification compared to EP. The distributions of the median window coverage in EP and EP + 3 were compared by one-way analysis of variance (ANOVA). To have an estimate of the chromosome copy number differences, the window coverage was further normalized by chromosome 19 median coverage and multiplied by 2. For each chromosome, the median values in EP and EP + 3 were compared. Both the ANOVA *P* values and the chromosome copy comparisons are reported in Table S4 at GitLab ([https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)).

**Gene sequencing coverage.** Samtools view (version 1.3) and BEDTools coverage (version 2.25.0) were used to measure the mean sequencing depth of every annotated gene and were run, respectively, with options “-q 50 -F 1028” and “-d -split.” Possible intragenic gap regions were excluded from the calculation of the mean. Then the mean coverage of each gene was normalized by the median coverage of its chromosome. To account for GC content sequencing bias, the coverage values were corrected using a LOESS regression with a 5-fold cross validation to optimize the model span parameter. Genes supported by reads with a mean mapping quality (MAPQ) score of <50 were filtered.

To enable CNV analysis of gene arrays and genes sharing high sequence identity, we clustered the nucleotide sequences of the annotated genes into groups with cd-hit (version 4.6) (39). We used the length difference cutoff option “-s 0.9.” Then we realigned the clusters with MAFFT (40) and used T-Coffee seq\_reformat (41) to select a representative gene per cluster (RefGene) showing the highest average sequence similarity to the other cluster members. If two genes had the same average similarity, then the shortest was chosen. We used bwa to build a database containing only the sequences of RefGene, adding  $\pm 50$  bp of the 5' and 3' ends to ease the read alignment and the quantification of small RefGenes. We realigned EP samples against this database using bwa mem with the option “-M.” We then quantified the RefGene mean coverage (without considering the  $\pm 50$ -bp extension) with Samtools view and BEDTools coverage using the options “-F 1028” and “-d -split,” respectively. Values were normalized by the median coverage of the RefGene's chromosome. Gene groups composed by members located on different chromosomes were negligible and discarded.

**Genome binning.** The reference genomes were divided into contiguous windows of a fixed length, and the sequencing coverage of each window was evaluated and compared across different samples. A window length of 300 bases was used for the shown scatter plots assessing genome-wide CNVs. Both the mean sequencing coverage normalized by the median chromosome coverage and the mean read MAPQ value were computed. To account for GC content sequencing bias, the coverage values were corrected using a LOESS regression with a 5-fold cross validation to optimize the model span parameter. The windows with a MAPQ score below 50 in either EP or EP + 3.1 were discarded. Poorly supported windows with a median or mean sequencing depth smaller than one-tenth of the median chromosome coverage both in EP and EP + 3.1 were also discarded. The windows with an EP + 3/EP coverage ratio outside the axis limits were placed on the edge (value of 3). In the genome browser tracks, the repeat elements and low-complexity regions were predicted with RepeatMasker (version 4.0.6) (RepeatModeler software; AFA Smit and R Hubley, RepeatModeler Open-1.0, 2008–2015 [<http://www.repeatmasker.org/>]) using the options “-e crossmatch -gff -xsmall -s” in combination with Rebase (42) to identify *Leishmania*-specific and ancestral repeats.

A window length of 2,000 bases was used for the shown Circos plots assessing chromosome amplification. Mean sequencing coverage and mean MAPQ score of the reads aligning to that window were reported. The histogram function of Circos (version 0.68-1) (43) was used to visualize the coverage of the windows, using a cutoff of 3. Windows with mean MAPQ score below 50 or overlapping genomic gaps of over 1 kb were assigned a sequencing coverage of 1.

**Single-nucleotide variant analysis.** To call single nucleotide variants (SNVs), we used FreeBayes (version v1.0.1-2-g0cb2697) (44) with options “-no-indels -no-mnps -no-complex -read-mismatch-limit 3 -read-snp-limit 3 -hwe-priors-off -binomial-obs-priors-off -allele-balance-priors-off -min-alternate-fraction 0.05 -min-base-quality 5 -min-mapping-quality 50 -min-alternate-count 2 -pooled-continuous.” The output was filtered to retain the positions with just one alternate allele with a minimum frequency of 0.9 and a minimum mean mapping quality of 20 for the reads supporting the reference or the alternative allele. SNVs mapping inside homopolymers (i.e., simple repeats of the same nucleotide) were filtered using a more stringent parameter, requiring at least 20 reads supporting the variant. The homopolymers were defined as the DNA region spanning  $\pm 5$  bases from the SNV, with over 40% of identical nucleotides. We discarded SNVs with sequencing coverage above or below 4 median absolute deviations (MADs). The predicted SNVs are reported in Table S5 at GitLab ([https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/)).

**Analysis of structural variants.** DELLY (version 0.6.7) (45) was run with option “-q 50” to predict balanced structural variations, including translocations and inversion. To reduce false predictions, the DELLY output was additionally filtered removing structural variants overlapping for more than 50% of their size with either assembly gaps or repetitive elements. Predictions mapping within 10 kb from the telomeric ends were removed to reduce false-positive results caused by possible misassembled regions close to the chromosome ends. Signals showing DELLY paired-end support of the structural variant (PE) or the high-quality variant pairs' score (DV) inferior to 20 were removed, as well as signals showing high-quality variant pairs inferior to 20. The predicted structural variants were represented with Circos.

**Synteny analysis.** The synteny analysis was performed with SyntView (46), a software package originally designed to compare microbial genomes. The tool was adapted to browse interactively the genome of four *Leishmania* reference genomes and explore their syntenic relation: *L. infantum* JPCM5, *L. donovani* PBQ7IC8, *L. major* Friedlin, and *L. donovani* BPK282A1. This new tool hosting *Leishmania* syntenic data is publicly available at <http://genopole.pasteur.fr/SyntView/flash/Leishmania/SynWebLininfantum.html>.

**Supplementary table availability.** All supplemental tables are publicly available at GitLab at [https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania\\_genome\\_dynamics\\_during\\_environmental\\_adaptation\\_reveals\\_strain\\_specific\\_differences/](https://gitlab.pasteur.fr/gbussott/Leishmania_genome_dynamics_during_environmental_adaptation_reveals_strain_specific_differences/).

**Accession number(s).** Reads were deposited in the Sequence Read Archive database (SRA) database (47) and are publicly available under accession no. [SRP126578](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRP126578).

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/mBio.01399-18>.

**FIG S1**, PDF file, 0.1 MB.

**FIG S2**, PDF file, 0.5 MB.

**FIG S3**, JPG file, 2.7 MB.

**FIG S4**, PDF file, 2.0 MB.

**FIG S5**, JPG file, 2.7 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a seeding grant from the Institut Pasteur International Department to the LeISHield Consortium, the EU FP7 (Kaladrug-R, contract 222895), the Belgian Science Policy Office (TRIT, P7/41), the Department of Economy, Science and Innovation in Flanders (ITM-SOFIB), and the Flemish Fund for Scientific Research (G.O.B81.12 to J.C.D. and F.D.).

## REFERENCES

- Späth GF, Drini S, Rachidi N. 2015. A touch of Zen: post-translational regulation of the Leishmania stress response. *Cell Microbiol* 17:632–638. <https://doi.org/10.1111/cmi.12440>.
- Sacks DL, Perkins PV. 1984. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. *Science* 223:1417–1419. <https://doi.org/10.1126/science.6701528>.
- Zilberstein D, Shapira M. 1994. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol* 48:449–470. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002313>.
- Brotherton MC, Bourassa S, Leprohon P, Légaré D, Poirier GG, Droit A, Ouellette M. 2013. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant Leishmania infantum mutant. *PLoS One* 8:e81899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081899>.
- Downing T, Imamura H, Decuyper S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, de Doncker S, Maes I, Mottram JC, Quail MA, Rijal S, Sanders M, Schönian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin JC, Berriman M. 2011. Whole genome sequencing of multiple Leishmania donovani clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res* 21:2143–2156. <https://doi.org/10.1101/gr.123430.111>.
- Laffitte MN, Leprohon P, Papadopoulou B, Ouellette M. 2016. Plasticity of the Leishmania genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res* 5:2350. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9218.1>.
- Leprohon P, Légaré D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette M. 2009. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant Leishmania infantum. *Nucleic Acids Res* 37:1387–1399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1069>.
- Mukherjee A, Boisvert S, Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Mukhopadhyay R, Corbeil J, Ouellette M. 2013. Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant Leishmania. *Mol Microbiol* 88:189–202. <https://doi.org/10.1111/mmi.12178>.
- Ubeda JM, Raymond F, Mukherjee A, Plourde M, Gingras H, Roy G, Lapointe A, Leprohon P, Papadopoulou B, Corbeil J, Ouellette M. 2014. Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite Leishmania. *PLoS Biol* 12:e1001868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001868>.
- Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC. 2011. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania. *Genome Res* 21:2129–2142. <https://doi.org/10.1101/gr.122945.111>.
- Zhang WW, Ramasamy G, McCall LI, Haydock A, Ranasinghe S, Abeygunasekara P, Sirimanna G, Wickremasinghe R, Myler P, Matlashewski G. 2014. Genetic analysis of Leishmania donovani tropism using a naturally attenuated cutaneous strain. *PLoS Pathog* 10:e1004244. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004244>.
- Dumetz F, Imamura H, Sanders M, Seblova V, Miskova J, Pescher P, Vanaerschot M, Meehan CJ, Cuypers B, De Muylder G, Späth GF, Bussotti G, Vermeesch JR, Berriman M, Cotton JA, Volf P, Dujardin JC, Domagalska MA. 2017. Modulation of aneuploidy in Leishmania donovani during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. *mBio* 8:e00599-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00599-17>.
- Prieto Barja P, Pescher P, Bussotti G, Dumetz F, Imamura H, Kedra D, Domagalska M, Chaumeau V, Himmelbauer H, Pages M, Sterkers Y, Dujardin JC, Notredame C, Späth GF. 2017. Haplotype selection as an adaptive mechanism in the protozoan pathogen Leishmania donovani. *Nat Ecol Evol* 1:1961–1969. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0361-x>.
- Clayton CE. 2016. Gene expression in kinetoplastids. *Curr Opin Microbiol* 32:46–51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.018>.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Dueterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. *Science* 309:436–442. <https://doi.org/10.1126/science.1112680>.
- Imamura H, Downing T, Van den Broeck F, Sanders MJ, Rijal S, Sundar S, Mannaert A, Vanaerschot M, Berg M, De Muylder G, Dumetz F, Cuypers B, Maes I, Domagalska M, Decuyper S, Rai K, Uranw S, Bhattarai NR, Khanal B, Prajapati VK, Sharma S, Stark O, Schönian G, De Koning HP, Settimo L, Vanhollebeke B, Roy S, Ostyn B, Boelaert M, Maes L, Berriman M, Dujardin JC, Cotton JA. 2016. Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *eLife* 5:e12613. <https://doi.org/10.7554/eLife.12613>.
- Alam MZ, Haralambous C, Kuhls K, Gouzelou E, Sgouras D, Soteriadou K, Schnur L, Pratloug F, Schönian G. 2009. The paraphyletic composition of Leishmania donovani zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. *Microbes Infect* 11:707–715. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.009>.
- Antoniu M, Haralambous C, Mazeris A, Pratloug F, Dedet JP, Soteriadou K. 2008. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis* 8:6–7. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70297-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70297-9).
- Antoniu M, Haralambous C, Mazeris A, Pratloug F, Dedet JP, Soteriadou K. 2009. Comment on Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis* 9:76–77. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70004-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70004-0).
- Zackay A, Cotton JA, Sanders M, Hailu A, Nasereddin A, Warburg A, Jaffe CL. 2018. Genome wide comparison of Ethiopian Leishmania donovani strains reveals differences potentially related to parasite survival. *PLoS Genet* 14:e1007133. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007133>.
- de Lange T. 2004. T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:323–329. <https://doi.org/10.1038/nrm1359>.
- Natarajan S, McEachern MJ. 2002. Recombinational telomere elongation

- promoted by DNA circles. *Mol Cell Biol* 22:4512–4521. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.13.4512-4521.2002>.
23. Kass-Eisler A, Greider CW. 2000. Recombination in telomere-length maintenance. *Trends Biochem Sci* 25:200–204. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01557-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01557-7).
  24. Muñoz-Jordán JL, Cross GA, de Lange T, Griffith JD. 2001. t-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J* 20:579–588. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.579>.
  25. Lambrechts L, Halbert J, Durand P, Gouagna LC, Koella JC. 2005. Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 4:3. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-3>.
  26. Gouzou E, Haralambous C, Amro A, Mentis A, Pralong F, Dedet JP, Votycka J, Volf P, Toz SO, Kuhls K, Schönian G, Soteriadou K. 2012. Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic *L. donovani sensu lato* group. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1507. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001507>.
  27. Logan-Klumpler FJ, De Silva N, Boehme U, Rogers MB, Velarde G, McQuillan JA, Carver T, Aslett M, Olsen C, Subramanian S, Phan I, Farris C, Mitra S, Ramasamy G, Wang H, Tivey A, Jackson A, Houston R, Parkhill J, Holden M, Harb OS, Brunk BP, Myler PJ, Roos D, Carrington M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Berriman M. 2012. Database issue. GeneDB—an annotation database for pathogens. *Nucleic Acids Res* 40:D98–D108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1032>.
  28. Li H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv arXiv:1303.3997v1 [q-bio.GN]*. <https://arxiv.org/abs/1303.3997>.
  29. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
  30. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
  31. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernytzky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ. 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43:491–498. <https://doi.org/10.1038/ng.806>.
  32. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.
  33. Stormo GD. 2013. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* 43:1–33. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1201s43>.
  34. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
  35. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
  36. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL. 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5:R12. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12>.
  37. Kersey PJ, Allen JE, Armean I, Boddu S, Bolt BJ, Carvalho-Silva D, Christensen M, Davis P, Falin LJ, Grabmueller C, Humphrey J, Kerhornou A, Khobova J, Aranganathan NK, Langridge N, Lowy E, McDowall MD, Maheswari U, Nuhn M, Ong CK, Overduin B, Paulini M, Pedro H, Perry E, Spudich G, Tapanari E, Walts B, Williams G, Tello-Ruiz M, Stein J, Wei S, Ware D, Bolser DM, Howe KL, Kulesha E, Lawson D, Maslen G, Staines DM. 2016. Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Res* 44:D574–D580. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1209>.
  38. Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26:841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
  39. Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>.
  40. Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33:511–518. <https://doi.org/10.1093/nar/gki198>.
  41. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
  42. Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J. 2005. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110:462–467. <https://doi.org/10.1159/000084979>.
  43. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* 19:1639–1645. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>.
  44. Garrison E, Marth G. 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv arXiv:12073907 [q-bio.GN]*. <https://arxiv.org/abs/1207.3907>.
  45. Rausch T, Zichner T, Schlattl A, Stütz AM, Benes V, Korbel JO. 2012. DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics* 28:i333–i339. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts378>.
  46. Lechat P, Souche E, Moszer I. 2013. SynTVView—an interactive multi-view genome browser for next-generation comparative microorganism genomics. *BMC Bioinformatics* 14:277. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-277>.
  47. Leinonen R, Sugawara H, Shumway M, International Nucleotide Sequence Database Collaboration. 2011. Database issue. The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Res* 39:D19–D21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019>.
  48. Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F, Manke T. 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* 44:W160–W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>.



# Cellular Markers of Active Disease and Cure in Different Forms of *Leishmania infantum*-Induced Disease

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Nicolas Blanchard,  
INSERM U1043 Centre de  
Physiopathologie de Toulouse Purpan,  
France

### Reviewed by:

Diego Luis Costa,  
National Institute of Allergy and  
Infectious Diseases (NIAID),  
United States  
Tais Berelli Saito,  
The University of Texas Medical  
Branch at Galveston, United States

### \*Correspondence:

Juan V. San Martín  
juanvictor.san@salud.madrid.org

†These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Parasite and Host,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and Infection  
Microbiology

**Received:** 18 June 2018

**Accepted:** 09 October 2018

**Published:** 13 November 2018

### Citation:

Botana L, Matía B, San Martín JV,  
Romero-Maté A, Castro A, Molina L,  
Fernandez L, Ibarra-Meneses A,  
Aguado M, Sánchez C, Horriño L,  
Chicharro C, Nieto J, Ortega S,  
Ruiz-Giardín JM, Carrillo E and  
Moreno J (2018) Cellular Markers of  
Active Disease and Cure in Different  
Forms of *Leishmania*  
*infantum*-Induced Disease.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:381.  
doi: 10.3389/fcimb.2018.00381

Laura Botana<sup>1†</sup>, Belén Matía<sup>2,3†</sup>, Juan V. San Martín<sup>2\*</sup>, Alberto Romero-Maté<sup>2</sup>,  
Alicia Castro<sup>2</sup>, Laura Molina<sup>2</sup>, Laura Fernández<sup>1</sup>, Ana Ibarra-Meneses<sup>1</sup>, Marta Aguado<sup>2</sup>,  
Carmen Sánchez<sup>1</sup>, Luis Horriño<sup>2</sup>, Carmen Chicharro<sup>1</sup>, Javier Nieto<sup>1</sup>, Sheila Ortega<sup>1</sup>,  
José Manuel Ruiz-Giardín<sup>2</sup>, Eugenia Carrillo<sup>1†</sup> and Javier Moreno<sup>1†</sup>

<sup>1</sup> WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain,

<sup>2</sup> Hospital Universitario de Fuenlabrada, Fuenlabrada, Madrid, Spain, <sup>3</sup> Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, Escuela Internacional de Doctorado, Universidad Rey Juan Carlos, Mostoles, Spain

Increased numbers of peripheral blood mononucleocytes (PBMC) and increased IFN- $\gamma$  secretion following *in vitro* challenge of blood samples with soluble *Leishmania* antigen (SLA), have been proposed as biomarkers of specific cell-mediated immunity, indicating that treatment of visceral leishmaniasis (VL) has been successful. However, *Leishmania infantum* infection may manifest as cutaneous leishmaniasis (CL), and less commonly as localized leishmanial lymphadenopathy (LLL) or mucosal leishmaniasis (ML). The present work examines the value of these biomarkers as indicators of cured leishmaniasis presenting in these different forms. Blood samples were collected before and after treatment from patients living in Fuenlabrada (Madrid, Spain), an *L. infantum*-endemic area recently the center of a leishmaniasis outbreak. All samples were subjected to *Leishmania*-specific PCR, serological tests (IFAT and rK39-ICT), and the SLA-cell proliferation assay (SLA-CPA), recording PBMC proliferation and the associated changes in IFN- $\gamma$  production. Differences in the results recorded for the active and cured conditions were only significant for VL. PCR returned positive results in 67% of patients with active VL and in 3% of those with cured leishmaniasis. Similarly, rK39-ICT returned a positive result in 77% of active VL samples vs. 52% in cured VL samples, and IFAT in 90% vs. 56%; in the SLA-CPA, PBMC proliferation was seen in 16% vs. 90%, and an associated increase in IFN- $\gamma$  production of 14 and 84%, respectively. The present findings reinforce the idea that PBMC proliferation and increased IFN- $\gamma$  production in SLA-stimulated PBMC provide biomarkers of clinical cure in VL. Other tests are urgently needed to distinguish between the cured and active forms of the other types of clinical leishmaniasis caused by *L. infantum*.

**Keywords:** visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, lymphadenopathic leishmaniasis, mucosal leishmaniasis, biomarker, cure, cell proliferation assay, IFN- $\gamma$

## INTRODUCTION

### A Wide Spectrum of Clinical Forms Produced by *L. infantum*

Leishmaniasis is a neglected, vector-borne disease with high morbidity caused by protozoan pathogens of the genus *Leishmania*. Over 350 million people in some 98 countries are at risk, and an estimated 1.3 million new cases of leishmaniasis are reported every year (WHO, 2010).

Infection with *Leishmania infantum* is manifested in different clinical forms. The most severe is visceral leishmaniasis (VL), in which the parasite is systemically disseminated; it is fatal if untreated. Cutaneous leishmaniasis (CL) is a benign form caused by the multiplication of *Leishmania* in the skin; these infections usually clear up spontaneously. Both these clinical forms are seen in Mediterranean countries. During the *L. infantum*-caused outbreak of leishmaniasis in Fuenlabrada (Madrid, Spain), VL was seen in about a third of people with clinical infection, and CL in most of the remainder (Suárez Rodríguez et al., 2012; Arce et al., 2013); a small number presented with mucosal leishmaniasis (ML) and leishmanial localized lymphadenopathy (LLL). LLL is characterized by long term lymphadenopathy with neither fever nor any other systemic symptom (Horrillo et al., 2015). These differences in the clinical presentation of the disease seem mainly attributable to the patient's immune status. Certainly, the molecular typing of *L. infantum* isolates from patients in Fuenlabrada revealed no association between genotype and disease type (Chicharro et al., 2013).

### Biomarkers Are Needed That Can Identify Cured Patients Following Treatment for Leishmaniasis

Treatment for leishmaniasis is usually effective, but relapses are common, especially in immunosuppressed patients (van Griensven et al., 2014). Confirmation of a final cure in both CL and VL is still based on clinical features after follow-up periods of 6 months; relapses commonly occur long after treatment has ended (Rijal et al., 2013). In immunocompetent patients with VL, a successful response to therapy depends on the activation of a Th1 subset of CD4+ *Leishmania*-specific T cells, and the production of IFN- $\gamma$ , which induces macrophage leishmanicidal activity (Kemp et al., 1993). Indeed, the proliferation of blood mononucleocytes (PBMC) after challenge with soluble leishmanial antigen (the soluble *Leishmania* antigen cell proliferation assay [SLA-CPA]) (Singh and Sundar, 2014; Carrillo et al., 2015), and increased IFN- $\gamma$  secretion by these cells (Hailu et al., 2004; Kumar et al., 2014), provide *in vitro* markers that might be used to assess early response to treatment. In fact, PBMC proliferation has been shown a useful indicator of the existence of *Leishmania*-specific T cell memory clones in HIV+ patients, sufficient to keep the parasitic infection under control and avoid relapsing VL (Castro et al., 2016). The value of IFN- $\gamma$  in monitoring the cellular immune response has previously been reported in VL caused by *L. infantum* (Cillari et al., 1995; Adem et al., 2016; Ibarra-Meneses et al., 2017).

The present work examines the value of these biomarkers and others as indicators of cured leishmaniasis presenting in its different forms; their sensitivity and specificity have been said to vary across the different manifestations of the disease (Kip et al., 2015). The results confirm that PBMC proliferation and increased IFN- $\gamma$  production following the challenge of blood samples with SLA, can be used to identify patients cured of VL. However, new biomarkers are required that are able to indicate the same in the other forms of *L. infantum*-induced disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Group, Blood Samples, and Tests Performed

The study subjects were 141 adult patients from Fuenlabrada (Madrid, Spain). All were diagnosed at the Hospital Universitario de Fuenlabrada between January 2013 and June 2015. Blood samples were collected during the period of active disease and after apparent cure. Active VL, CL, and ML was defined according to WHO definitions (WHO, 2010). LLL was defined as isolated adenopathy with no other systemic symptom (Ignatius et al., 2011; Horrillo et al., 2015). Blood samples were obtained from 33 patients with active VL, 27 from those with active CL, 6 from those with active LLL, and 2 from those with active ML. Post-supposed-cure blood samples were available from 61 patients originally diagnosed with active VL, 41 with CL, 21 with LLL, and 3 with ML, with cure defined as being free of leishmaniasis symptoms 6 months after the end of treatment (WHO, 2010). None of the cured patients has relapsed after 2 further years of follow-up.

All samples were analyzed by *Leishmania*-specific nested PCR to detect leishmanial DNA. *Leishmania*-specific antibodies were determined in plasma using the rK39 immunochromatographic test (rK39-ICT) and immunofluorescent antibody test (IFAT). PBMC proliferation after stimulation with SLA was measured (SLA-CPA assay), and the accompanying production of IFN- $\gamma$  recorded.

### DNA Extraction and Nested PCR

Genomic DNA was extracted from 100  $\mu$ l of peripheral blood using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's recommendations, and eluted in a final volume of 200  $\mu$ l of PCR-grade water. The extracts were stored at 4°C until PCR analysis (maximum of 3 days). *Leishmania* DNA was detected by nested PCR (LnPCR), targeting the small subunit ribosomal ribonucleic acid gene SSU-rRNA (18S RNA). A first amplification step was performed using primers R221 and R332 (van Eys et al., 1992); the PCR product was then tested in a subsequent amplification step with primers R233 and R333, as described by Cruz et al. (2002).

### Immunofluorescent Antibody Test

$2 \times 10^5$  *L. infantum* promastigotes (JPC strain MCAN/ES/98/LLM-722) in PBS were fixed to glass slides. Two-fold serial dilutions of plasma—from 1/20 to 1/640 in PBS—were then added to separate preparations. The total IgG concentration

was then determined by adding fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human IgG (Fluoline G) (Bio-Mérieux, France) diluted 1/200. The threshold titre for positivity was set at the 1/80 plasma dilution level.

### rK39 Immunochromatographic Test

Antibody detection was performed using the dipstick format Kalazar Detect Rapid Test (InBIOS International, Seattle, WA) according to the manufacturer's instructions.

### Preparation of Soluble *L. infantum* Antigen for SLA-CPA

*L. infantum* antigen extract was prepared from stationary phase promastigote cultures (JPC strain, MCAN/ES/98/LLM-722) as previously described (Carrillo et al., 2015). Briefly, parasites resuspended in lysis buffer (50 mM Tris/5 mM EDTA/HCl, pH 7) were subjected to three rapid freeze/thaw cycles followed by three 20 s 40 W pulses with a sonicator. These samples were then subjected to two consecutive rounds of centrifugation at 27,000 g and 4°C for 20 min. The supernatants were then collected, aliquoted, and stored at -80°C until use. Protein quantification was performed using the Bradford method employing the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, California, USA).

### SLA-Cell Proliferation Assay (SLA-CPA)

PBMC were isolated by density centrifugation through Ficoll-Hypaque (Rafer, Spain). The collected cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol, and 1 mM sodium pyruvate. They were then plated in 96 well-plates and kept with RPMI 1640 medium alone (unstimulated) or with added SLA (10 µg/ml). All were kept in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 5 days. Cell proliferation was measured by bromodeoxyuridine incorporation using the Cell Proliferation Biotrak ELISA Kit (General Electric Healthcare Life Sciences, UK). The results are shown as a stimulation index (SI).

### Cytometric Quantification of IFN-γ

IFN-γ production was determined in 50 µl of the supernatants from the above SLA-stimulated and control PBMC cultures

using the BD Cytometric Bead Array Human Flex Set (Beckton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA), as previously described (Carrillo et al., 2015). Supernatants were collected and stored at -20°C for cytokine analysis. Data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer and analyzed using the Flow Cytometric Analysis Program Array (Beckton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA). IFN-γ production was expressed (in pg/ml) as the difference between the concentration in SLA-stimulated and control supernatants.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS package (Chicago, IL, USA) or GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, CA, USA). Cut-offs were determined by calculating the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) and the 95% confidence interval (CI). Values for variables recorded before and after treatment were compared using the Mann-Whitney U-test. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### The Parasitological and Serological Tests Identified Cured VL, but Not Cured CL, LLL, or ML

The results of the PCR (in particular), rK39-ICT and IFAT tests for active and cured VL were significantly different, thus identifying the cured condition (Table 1).

In contrast, PCR detected parasite DNA in very few CL, LLL or ML blood samples with no significant differences recorded between the active and cured conditions. Similarly, the rK39-ICT and IFAT tests returned very similar results for the active and cured forms of these disease presentations (Table 1).

### Cell-Mediated Immunity: PBMC Proliferation and IFN-γ Production as Biomarkers of Cured VL

Analysis of cell-mediated immunity in the different clinical conditions revealed significant differences between active and cured conditions only for VL (Table 1): indeed, most of the patients with active VL showed no *Leishmania*-specific cell-mediated immunity, but did so after effective treatment, with

**TABLE 1 |** Percentage of positive results returned by parasitological, serological, and cellular immunity tests, in patients with active (A) and cured (C) leishmaniasis.

Clinical condition	PCR (%)		rK39 (%)		IFAT (%)		SLA-CPA (%) <sup>a</sup>		IFN-γ (%) <sup>b</sup>	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Visceral leishmaniasis	67	3***	77	52*	90	56*	16	90****	14	84****
Cutaneous leishmaniasis	4	2	4	2	0	2	33	56	31	62
Leishmanial lymphadenopathy	0	0	33	43	33	14	52	67	47	75
Mucosal leishmaniasis	0	0	100	67	50	67	33	100	33	100

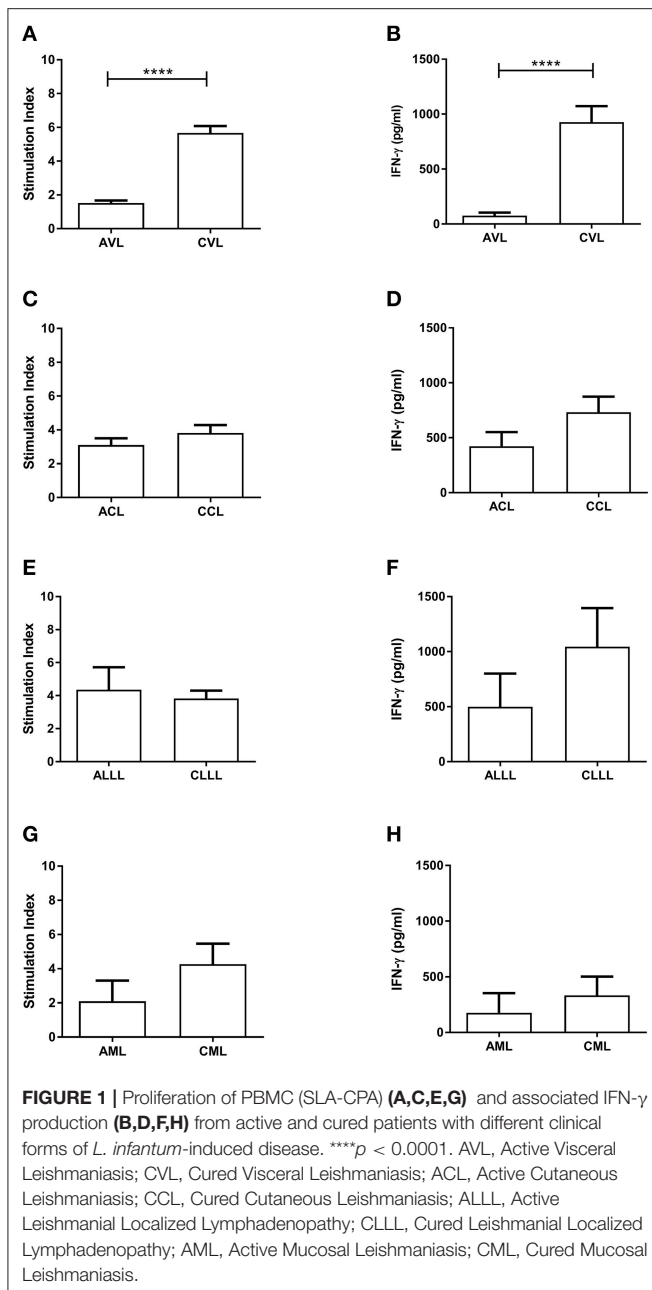
<sup>a</sup>The stimulation index cut-offs for SLA-CPA (ROC curve) were = 2.53 for VL, 2.26 for CL, 3.16 for LLL, and 4.23 for ML.

<sup>b</sup>The cut-offs for increased IFN-γ production after SLA stimulation of blood (ROC curve) were = 133.4 pg/ml for VL, 314.1 pg/ml for CL, 406.2 pg/ml for LLL, and 406.6 pg/ml for ML.

\* $p < 0.050$ .

\*\*\* $p < 0.001$ .

\*\*\*\* $p < 0.0001$ .



PBMC proliferation confirmed (Figure 1A,  $p < 0.0001$ ) and IFN- $\gamma$  levels increased (Figure 1B,  $p < 0.0001$ ) (cut-offs: Stimulation index = 2.53; IFN- $\gamma$  = 133.4 pg/ml). No such conversion was seen in any other disease presentation type (Figures 1C–H).

## Lack of Surrogate End-Points to Define Cure in Leishmaniasis

A confirmation of cure has traditionally been based on clinical features, such as the normalization of body temperature, a reduction in the size of the liver and spleen, and an increase in peripheral blood leukocytes, hemoglobin and platelets in VL, or the healing of lesions in CL. However, observations have to

be made over long follow-up times since relapses may occur long after treatment ends. Unfortunately, PCR and serological tests are not good indicators of cure (WHO, 2017). PCR detects parasites in active VL, but after the first doses of treatment their numbers can fall dramatically (Castro et al., 2016) while clinical manifestations of disease remain. Further, the non-detection of peripheral blood parasites does not necessarily mean that the spleen, liver, or bone marrow are parasite-free, which might allow for the reactivation of clinical disease months later, as repeatedly reported in immunosuppressed patients (van Griensven et al., 2014). PCR results on their own cannot, therefore, provide a reliable marker of cure. Neither can serological tests (rK39-ICT and IFAT) be used to identify cure: antibodies are present in active VL but persist long after cure (Hailu et al., 2004; WHO, 2010).

## Cell-Mediated Immunity Tests for Monitoring Treatment

The development of solid cell-mediated immunity rendering patients resistant to reinfection only occurs after successful treatment and the start of healing (Kemp et al., 1993; Kumar et al., 2014). Early monitoring of response to treatment (for both VL and CL) therefore requires specific biomarkers be identified that correlate with the development of this immunity (WHO, 2017). PBMC proliferation and increased IFN- $\gamma$  production upon stimulation with SLA are expressions of this immunity, and can be easily and repeatedly evaluated *ex vivo* without patient sensitization (Carrillo et al., 2015). In addition, these two biomarkers have added value in terms of allowing a “no relapse” prognosis to be made: both are directly associated with the immunological control of the parasite and the absence of reactivation. By way of comparison, while PCR can confirm parasite elimination in blood, it cannot predict whether the disease might be reactivated by cryptic parasites in the target organs.

The appearance of cell-mediated immunity after successful treatment has also been reported for *Leishmania donovani* (WHO, 2017). PBMC proliferation and an associated increase in IFN- $\gamma$  production upon the stimulation of blood samples with SLA might therefore provide global markers of cure in VL (Adem et al., 2016; Castro et al., 2016). Our group has already shown that a patent cell proliferative response remains long after treatment, that it is useful for monitoring disease in immunosuppressed patients with VL (Castro et al., 2016), and that it is associated with a lack of relapse (Hailu et al., 2004; Singh and Sundar, 2014).

## Lack of Biomarkers for Identifying Cure in CL, LLL, and ML

The present results show that none of the tests examined could distinguish between active disease and cure in CL, LLL, or ML. In fact, many patients with CL and LLL returned positive SLA-CPA results (i.e., PBMC proliferation) *before* treatment, revealing an active cell-mediated immune response to be underway. The same response has been described in patients with active CL caused by *L. major*, which appears to be associated with the spontaneous healing of the lesion. In active CL, a lack of PBMC

proliferation and low IFN- $\gamma$  production (together with IL-4 production) following SLA challenge *in vitro* has been associated with severe disease and a lack of healing (Gaafar et al., 1995; Ajdary et al., 2000).

The mean stimulation index values recorded after SLA challenge shows the cell-mediated immune response against *Leishmania* to be strongest in patients cured of VL. Differences in this response between patients cured of VL and CL have been reported previously, and might reflect a stronger systemic Th-1 response to occur in the former given the need to clear a much heavier parasite burden (Turgay et al., 2010; Alimohammadian et al., 2012). The patients with LLL—perhaps an evolved form of CL—showed the strongest immunological response before treatment, with *Leishmania* parasites present in affected lymph glands near the site of the *Phlebotomus* bite (Horrillo et al., 2015). The intense immunological activity in lymph nodes probably results in an immune over-reaction against the parasite. No information on the immunological features of LLL has previously been reported.

The present study suffers from the limitation of the imbalance in patient numbers between the groups; indeed, the numbers of patients with active ML and LLL are too small to be able to draw safe conclusions. To our knowledge, however, this is the first time that the immune response of such a large number of individuals with different clinical forms of disease caused by *L. infantum*, and all from the same endemic area, has been examined.

Individual differences in the immune response to *L. infantum* result in different clinical outcomes. The absence of a specific cell-mediated response to the parasite in patients with active VL allows *in vitro* SLA-activated PBMC proliferation and the associated increase in IFN- $\gamma$  production—all of which occurs after successful treatment—to act as biomarkers of cure in this disease type. Their use might improve patient follow-up and reduce the cost of clinical trials of VL treatments. In patients with active CL, LLL, and ML, the cell-mediated response observed

in a large number of patients seems capable of preventing the spread of the parasite to the internal organs, but it provides no indicator of cure since there are no differences before and after treatment. Biomarkers of cure of CL, LLL, and ML are, therefore, still needed.

## ETHICS STATEMENT

This study was approved by the Hospital de Fuenlabrada (Madrid) Ethics and Research Committee (APR 12-65 and APR 14-64). All patients gave their written informed consent to be involved.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JS, AR-M, JR-G, EC, and JM contributed conception and design of the study. BM, AR-M, AC, LM, MA, and LH recruited patients and collected samples. LB, LF, AI-M, CS, CC, JN, and SO did immunological tests. LB, BM, and JS organized the database and performed the statistical analysis. LB and BM wrote the first draft of the manuscript. JS, EC, and JM wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was funded by the *Instituto de Salud Carlos III* via the *Red de Enfermedades Tropicales, Subprograma RETICS del Plan Estatal de I+D+I 2013-2016*, which is co-funded by FEDER Una manera de hacer Europa funds, via projects RD16/0027/0017 and RD16CIII/0003/0002.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Hospital Universitario de Fuenlabrada for their assistance in the collection of blood samples.

## REFERENCES

- Adem, E., Tajebe, F., Getahun, M., Kiflie, A., Diro, E., Hailu, A., et al. (2016). Successful treatment of human visceral leishmaniasis restores antigen-specific IFN- $\gamma$ , but not IL-10 production. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004468. doi: 10.1371/journal.pntd.0004468
- Ajdary, S., Alimohammadian, M. H., Eslami, M. B., Kemp, K., and Kharazmi, A. (2000). Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect. Immun.* 68, 1760–1764. doi: 10.1128/IAI.68.4.1760-1764.2000
- Alimohammadian, M. H., Jones, S. L., Darabi, H., Riazirad, F., Ajdary, S., Shabani, A., et al. (2012). Assessment of interferon- $\gamma$  levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 70–75. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0479
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., et al. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 18:20546. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20546
- Carrillo, E., Carrasco-Antón, N., López-Medrano, F., Salto, E., Fernández, L., San Martín, J. V., et al. (2015). Cytokine release assays as tests for exposure to *Leishmania*, and for confirming cure from leishmaniasis, in solid organ transplant recipients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0004179. doi: 10.1371/journal.pntd.0004179
- Castro, A., Carrillo, E., San Martín, J. V., Botana, L., Molina, L., Matía, B., et al. (2016). Lymphoproliferative response after stimulation with soluble *Leishmania* antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients. *Acta Trop.* 164, 345–351. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.09.026
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I. P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., and Cruz, I. (2013). Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 18:20545. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20545
- Cillari, E., Vitale, G., Arcoleo, F., D'Agostino, P., Mocciaro, C., Gambino, G., et al. (1995). *In vivo* and *in vitro* cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. *Cytokine* 7, 740–745. doi: 10.1006/cyto.1995.0088
- Cruz, I., Cañavate, C., Rubio, J. M., Morales, M. A., Chicharro, C., Laguna, F., et al. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing

- and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (Suppl. 1), S185–S189. doi: 10.1016/S0035-9203(02)90074-X
- Gaafar, A., Kharazmi, A., Ismail, A., Kemp, M., Hey, A., Christensen, C. B., et al. (1995). Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clin. Exp. Immunol.* 100, 239–245. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb03660.x
- Hailu, A., van der Poll, T., Berhe, N., and Kager, P. A. (2004). Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 561–567. doi: 10.4269/ajtmh.2004.71.561
- Horrillo, L., San Martín, J. V., Molina, L., Madroñal, E., Matía, B., Castro, A., et al. (2015). Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 269–273. doi: 10.1016/j.cmi.2014.10.017
- Ibarra-Meneses, A. V., Ghosh, P., Hossain, F., Chowdhury, R., Mondal, D., Alvar, J., et al. (2017). IFN- $\gamma$ , IL-2, IP-10, and MIG as biomarkers of exposure to *Leishmania* spp., and of cure in human visceral leishmaniasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:200. doi: 10.3389/fcimb.2017.00200
- Ignatius, R., Loddenkemper, C., Woitzik, J., Schneider, T., and Harms, G. (2011). Localized leishmanial lymphadenopathy: an unusual manifestation of leishmaniasis in a traveler in Southern Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 1213–1215. doi: 10.1089/vbz.2011.0642
- Kemp, M., Kurtzhals, J. A., Kharazmi, A., and Theander, T. G. (1993). Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. *Immunol. Cell Biol.* 71 (Pt 6), 583–587.
- Kip, A. E., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M., de Vries, P. J., and Dorlo, T. (2015). Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1–14. doi: 10.1128/AAC.04298-14
- Kumar, R., Singh, N., Gautam, S., Singh, O. P., Gidwani, K., Rai, M., et al. (2014). *Leishmania* specific CD4T cells release IFN $\gamma$  that limits parasite replication in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e3198. doi: 10.1371/journal.pntd.0003198
- Rijal, S., Ostin, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N. R., Dorlo, T., et al. (2013). Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1530–1538. doi: 10.1093/cid/cit102
- Singh, O. P., and Sundar, S. (2014). Whole blood assay and visceral leishmaniasis: challenges and promises. *Immunobiology* 219, 323–328. doi: 10.1016/j.imbio.2014.01.005
- Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M. J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J., et al. (2012). [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Rev. Esp. Salud Pública* 86, 555–564. doi: 10.4321/S1135-57272012000600002
- Turgay, N., Balcioglu, I. C., Toz, S. O., Ozbel, Y., and Jones, S. L. (2010). Quantiferon-*Leishmania* as an epidemiological tool for evaluating the exposure to *Leishmania* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 822–824. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0605
- van Eys, G. J., Schoone, G. J., Kroon, N. C., and Ebeling, S. B. (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 133–142. doi: 10.1016/0166-6851(92)90208-2
- van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L., and Moreno, J. (2014). Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 286–299. doi: 10.1111/1469-0691.12556
- WHO (2010). *Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (2017). *Manual on Case Management and Surveillance of the Leishmaniases in the WHO European Region*. World Health Organization.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Botana, Matía, San Martín, Romero-Maté, Castro, Molina, Fernández, Ibarra-Meneses, Aguado, Sánchez, Horrillo, Chicharro, Nieto, Ortega, Ruiz-Giardin, Carrillo and Moreno. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.