

InfoLEISH

Boletín informativo de la redLEISH - 8ª edición

Mayo de 2024



EDITORIAL - BYRON ARANA, DNDi

Hace doce años, el equipo de leishmaniasis de DNDi se embarcó en una misión con pasión, compromiso y esperanza para encontrar tratamientos más seguros y eficaces contra la leishmaniasis cutánea (LC). Como parte de este esfuerzo y con el objetivo de fomentar el intercambio de información, conocimientos y desarrollar actividades colaborativas, hace diez años se creó la redLEISH. Al celebrar el décimo aniversario de la redLEISH, queremos expresar nuestra gratitud por el apoyo, el entusiasmo y la dedicación de todos sus miembros y colaboradores que, directa o indirectamente, han contribuido a alcanzar los objetivos de la redLEISH.

El desarrollo de nuevos tratamientos para la LC ha sido un camino lleno de retos y contratiempos. Uno de los principales retos es la falta de financiación atribuida, entre otros factores, a que la enfermedad no se considera mortal, dejando de lado sin embargo otros im-

portantes problemas causados por la enfermedad como el estigma, las cicatrices cutáneas, la segregación, la salud mental, etc, que afectan a los más de un millón de personas que padecen LC cada año.

A pesar de estas dificultades, se han hecho progresos. Por ejemplo, intervenciones existentes como la termoterapia ya están disponibles en la mayoría de los países latinoamericanos, un esfuerzo que ha sido liderado por la Organización Panamericana de la Salud con el apoyo de la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas.

El intento de mejorar la eficacia de las intervenciones terapéuticas actuales nos ha llevado a evaluar la combinación de una única aplicación de termoterapia con 3 semanas de miltefosina oral. Los resultados finales de un estudio de Fase III realizado en 6 instituciones participantes en la redLEISH en Brasil, Bolivia, Panamá y Perú se informarán a finales de 2024.

Un avance emocionante en el campo de las terapias dirigidas al sistema inmunológico del huésped es la transición de CpG D35 de la fase preclínica a la fase inicial de desarrollo clínico. En voluntarios sanos, la administración de CpG D35 ha demostrado ser segura y capaz de promover la respuesta inmunitaria que se ha asociado al control de la enfermedad. Hemos avanzado con un estudio de dosis múltiples ascendentes en pacientes con LC.

De cara al futuro, durante el último año el equipo ha estado trabajando para iniciar en 2025 un estudio de Fase II para evaluar la seguridad y eficacia de un nuevo compuesto oral desarrollado por Novartis, que en estudios con animales e *in vitro* ha demostrado ser activo contra las especies de *Leishmania* causantes de la LC.

En general, ha sido un viaje apasionante, con muchas razones para no perder la esperanza y seguir apoyando los esfuerzos coordinados en la búsqueda de nuevos tratamientos para la leishmaniasis cutánea. •



Sumario

01 EDITORIAL

02 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK3) COMO POTENCIAL TERAPIA ANTI-LEISHMANIA

06 LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA DE KINETOPLÁSTIDOS, UNA NUEVA OPORTUNIDAD DE TRATAMIENTO PARA EL MANEJO DE LA LEISHMANIASIS

08 ATI-1801 DE APPILI THERAPEUTICS: HACIA UN TRATAMIENTO SEGURO Y EFICAZ PARA LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA

09 DIRECTRICES DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN LAS AMÉRICAS

13 AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN EL PUNTO DE ATENCIÓN PARA LAS ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS CUTÁNEAS

15 FORMALIZACIÓN DE LA ASOCIACIÓN BRASILEÑA DE PACIENTES AFECTADOS POR LEISHMANIASIS - ABRAPLEISH

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK3) COMO POTENCIAL TERAPIA ANTI-LEISHMANIA



PRISCILA Z. RAMOS, KATLIN B. MASSIRER, GABRIELA BARREIRO y CAROLINA M. C. CATTAPRETA, Centro de Química Medicinal (CQMED), Centro de Biología Molecular e Ingeniería Genética (CBMEG), UNICAMP, Brasil, **TANIRIS C. BRAGA**, Centro de Química Medicinal (CQMED), Centro de Biología Molecular e Ingeniería Genética (CBMEG), UNICAMP, Brasil/Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil, **JULIANA I. AOKI**, Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil/Instituto de Biología, UNICAMP, Brasil, **JÚLIA L. MONTEIRO, VITOR M. ALMEIDA y CARINE C. DREWES**, Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil, **ADRIANO C. COELHO**, Instituto de Biología, UNICAMP, Brasil, **JADEL M. KRATZ y LUIZA CRUZ**, DNDi América Latina, Brasil, **RONALDO A. PILLI**, Instituto de Química, UNICAMP, Brasil, **RAFAEL M. COUÑAGO**, Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil/Consortio de Genómica Estructural, Facultad de Farmacia UNC Eshelman, Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, EE.UU.

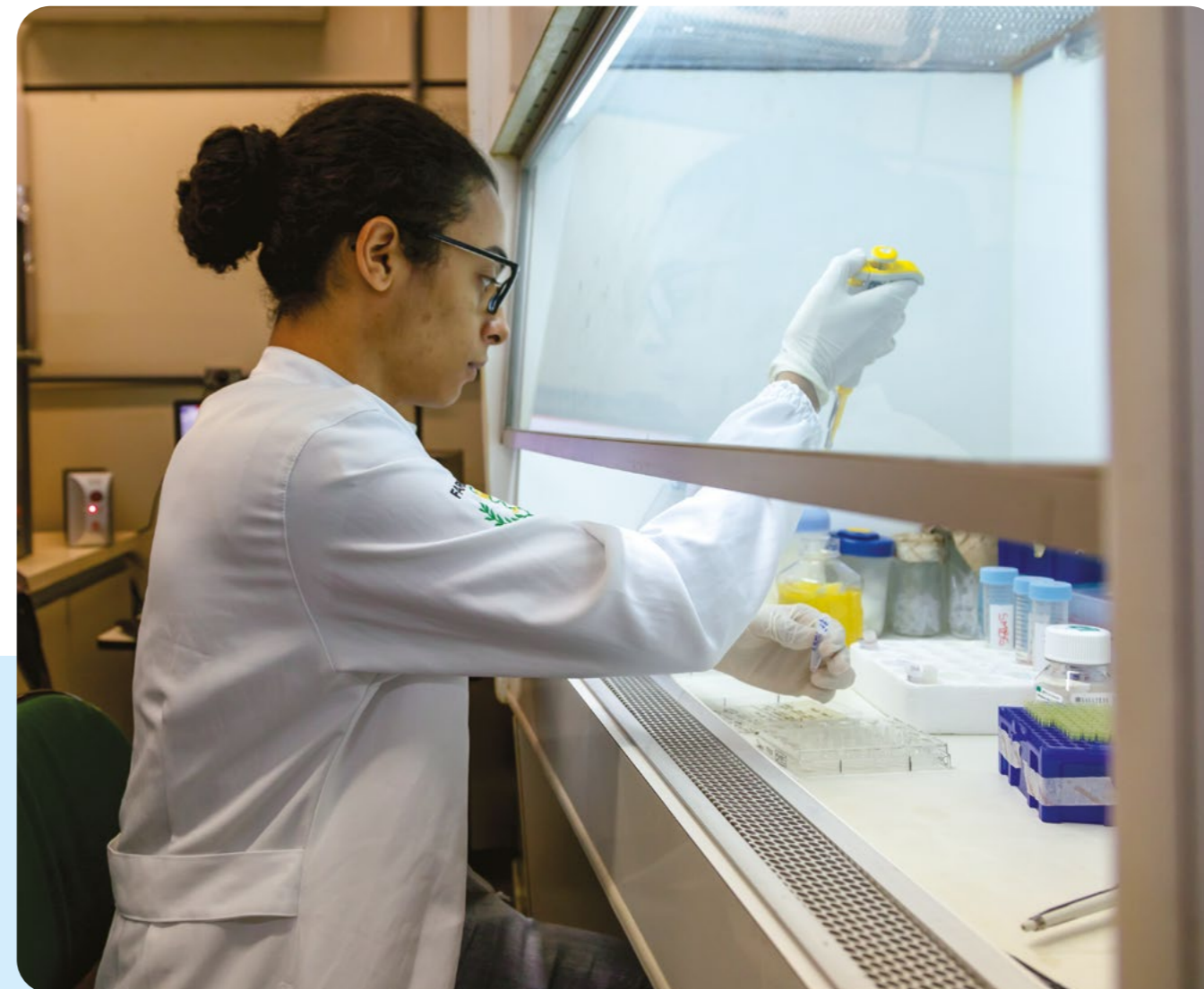
En las últimas décadas, se han logrado muchos avances en el tratamiento de la leishmaniasis, lo que ha llevado a resultados más favorables y a una comprensión más profunda de la enfermedad. Sin embargo, los tratamientos actuales aún presentan problemas como la toxicidad, los altos

costos, el surgimiento de resistencia a los medicamentos, la larga duración y la eficacia limitada.

Estos desafíos subrayan la necesidad de investigaciones continuas en estrategias de descubrimiento de fármacos basado en la diana. Estas estrategias se centran

en identificar vías biológicas específicas o proteínas cruciales para la supervivencia y virulencia del parásito, ofreciendo la posibilidad de desarrollar opciones terapéuticas más eficaces y menos tóxicas.

Para explorar el uso de estrategias basadas en la diana e identificar posibles



dianas terapéuticas para la leishmaniasis, establecimos un consorcio multidisciplinario compuesto por investigadores de la Universidad de Campinas (Unicamp), del Centro de Química Medicinal de Unicamp (CQMED), de la DNDi y Eurofarma. Esta iniciativa, denominada Leish-SBDD, cuenta con la experiencia de más de 20 investigadores y recibe apoyo financiero tanto público como privado.

A pesar del éxito en diversas áreas clínicas, las estrategias basadas en la diana aún no han generado medicamentos para la leishmaniasis y otras enfermedades causadas por parásitos eucariotas, como la enfermedad de Chagas y la malaria. Un desafío importante en la aplicación de estrategias

basadas en la diana contra los protozoos parásitos surge de una falta de conocimiento general sobre la biología compleja de estos organismos. Esta brecha de conocimiento se debe, en parte, a la disponibilidad limitada de herramientas moleculares y químicas necesarias para identificar proteínas o procesos biológicos cruciales para la supervivencia del parásito en el huésped humano. Estas proteínas esenciales, una vez identificadas, podrían servir como dianas ideales para terapias innovadoras.

La reciente implementación de la tecnología CRISPR-Cas9 para la edición génica en *Leishmania* ha permitido a los investigadores identificar genes esenciales para la diferenciación y supervivencia

del parásito. Esto ha llevado a la identificación de varios genes de *Leishmania* que codifican proteínas quinasas que desempeñan un papel crucial en la supervivencia del parásito en un huésped mamífero¹. Las proteínas quinasas actúan como los principales reguladores de las cascadas de señalización celular, controlando procesos como la proliferación y muerte celular. En consecuencia, han sido ampliamente exploradas como dianas terapéuticas para diversas enfermedades humanas. Este descubrimiento ha abierto el camino para aprovechar el vasto conjunto de herramientas de química medicinal disponibles para las proteínas quinasas humanas en el descubrimiento de fármacos contra *Leishmania*. »

Referencias

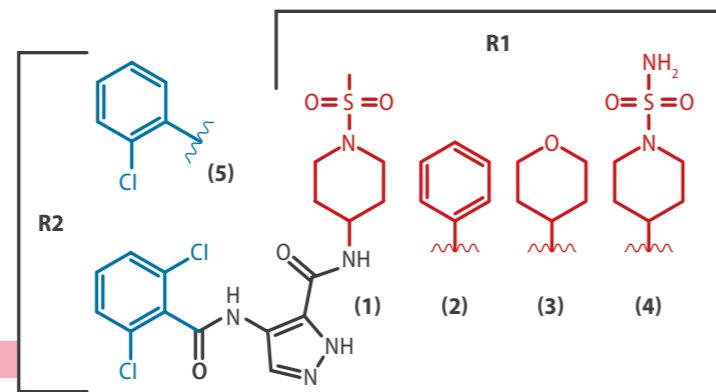
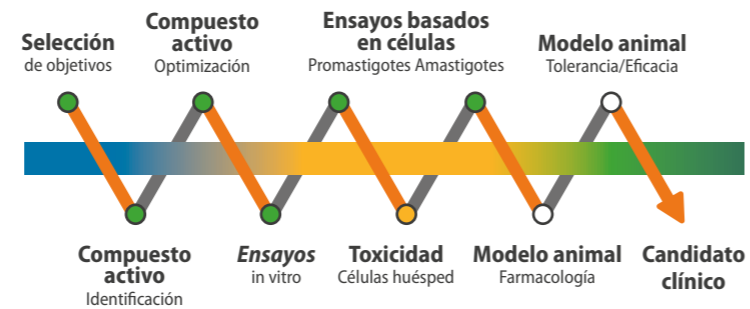
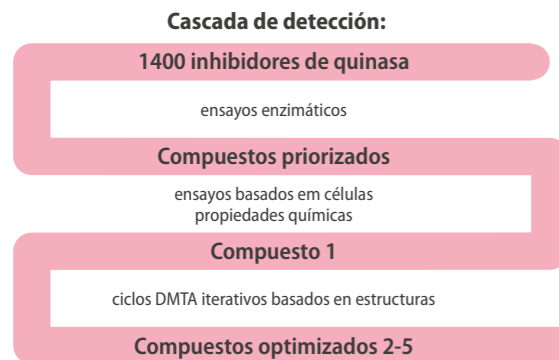
1. Baker, N., Catta-Preta, C.M.C., Neish, R. et al. Systematic functional analysis of Leishmania protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 1244, 2021.





SBDD-Leish

Pipeline de descubrimiento de fármacos basada en estructuras



Actividad del compuesto:

	Enzima purificada <i>in vitro</i> (K _i - μM)*			Ensayos basados en células (EC ₅₀ - μM)*		
	<i>Linf</i> GSK3α	<i>Linf</i> GSK3β	Promastigotes de vida libre	Toxicidad - macrófagos derivados de la médula ósea de ratón (BMDM)	BMDM de ratón - amastigotes internalizados	Índice de Selectividad (SI)*
1	3 x 10 ⁻⁵	2 x 10 ⁻⁵	3 x 10 ⁻¹	8	1	8
2	>1	2 x 10 ⁻⁴	3	52	3	17
3	5 x 10 ⁻¹	2 x 10 ⁻⁵	5 x 10 ⁻²	12	2	6
4	2 x 10 ⁻⁵	2 x 10 ⁻⁵	5 x 10 ⁻¹	17	1	17
5	1 x 10 ⁻⁵	5 x 10 ⁻⁵	9 x 10 ⁻²	19	1	19
Miltefosina	No probada	No probada	17	76	2	38

* K_i - constante inhibidora; EC₅₀ - concentración efectiva media máxima; SI - el índice de selectividad se calcula dividiendo los valores de EC₅₀ de un compuesto obtenido en macrófagos hospedadores por los obtenidos para amastigotes internalizados en macrófagos.

Figura 1 – La Plataforma de Descubrimiento de Fármacos Basado en la Diana del consorcio SBDD-Leish identificó inhibidores prometedores de GSK3 que exhiben una actividad anti-*Leishmania* comparable a la miltefosina, un medicamento aprobado para la leishmaniasis visceral.



Nuestro Consorcio SBDD-Leish optó por investigar el potencial terapéutico de dos quinasa identificadas como esenciales en estudios genéticos: la glucógeno sintasa quinasa 3 alfa y beta de *Leishmania infantum* (*Linf* GSK3α y *Linf* GSK3β), el agente causal de la leishmaniasis visceral en América Latina. Evidencia adicional que respalda a *Linf*GSK3β como potencial diana terapéutica fue proporcionada por Xingi y colaboradores, quienes demostraron que los inhibidores de esta enzima fueron activos contra el parásito en cultivo². Uno de los desafíos en el desarrollo de inhibidores para quinasa de parásitos es el potencial de que estos compuestos también inhiban quinasa del huésped humano, lo que resulta en efectos tóxicos. Por lo tanto, el objetivo principal de nuestro proyecto fue desarrollar inhibidores de GSK3 de *L. infantum* que fueran efectivos contra el parásito y al mismo tiempo fueran inofensivos para las células humanas. Utilizamos la miltefosina, un medicamento aprobado clínicamente para el tratamiento de la leishmaniasis visceral, como referencia para evaluar la actividad anti-*Leishmania* y la toxicidad de nuestros nuevos compuestos para las células huésped.

Para lograr este objetivo, nuestro Consorcio desarrolló los reactivos y ensayos necesarios para respaldar la plataforma de descubrimiento de fármacos basado en la diana (Figura 1). Esto implicó producir *Linf*GSK3α y *Linf*GSK3β recombinantes para desarrollar ensayos *in vitro* y medir la actividad de posibles

inhibidores de estas enzimas. Además, determinamos la estructura cristalina de *Linf*GSK3β unida a inhibidores de quinasa mediante cristalografía de rayos X para obtener una comprensión detallada de la interacción entre la enzima y sus inhibidores. También establecimos ensayos celulares para evaluar el impacto de los compuestos en la viabilidad de *L. infantum*, tanto en promastigotes como en amastigotes intracelulares clínicamente relevantes, utilizando macrófagos derivados de la médula ósea de ratón (del inglés: *bone-marrow derived mouse macrophages* - BMDM) como células huésped. Finalmente, organizamos una colección de 1400 inhibidores de quinasa que se esperaba que exhibieran actividad contra *Linf*GSK3α y *Linf*GSK3β.

De hecho, el cribado de nuestra colección centrada en las quinasa identificó varios inhibidores potentes de *Linf*GSK3α y *Linf*GSK3β. Estos inhibidores fueron evaluados más a fondo en ensayos celulares utilizando promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. infantum*. Los resultados de los ensayos enzimáticos y fenotípicos, junto con una evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos activos, guiaron nuestra selección del compuesto pirazolcarboxiamida **1** como punto de partida para un programa de química medicinal con el objetivo de mejorar su potencia contra *Linf*GSK3α y *Linf*GSK3β, así como como su actividad anti-*Leishmania* contra las formas amastigotes intracelulares de *L. infantum*, al mismo tiempo

que se reduce su toxicidad hacia las células huésped de mamíferos.

Nuestros químicos medicinales utilizaron la estructura cristalina de *Linf*GSK3β para obtener una comprensión más profunda de su interacción con los compuestos de pirazolcarboxiamida. Luego diseñaron modificaciones al compuesto **1** con el objetivo de mejorar su actividad y propiedades farmacológicas. Se iniciaron ciclos iterativos de Diseño-Síntesis-Prueba-Análisis, que incluyeron la prueba de 35 nuevas moléculas contra las quinasa de *Leishmania in vitro*, así como contra el parásito y las células huésped de mamíferos en cultivo.

Estos esfuerzos resultaron en el descubrimiento de compuestos optimizados (**2** – **5**) que fueron más potentes contra las enzimas purificadas y, lo que es más importante, hasta dos veces más activos en los amastigotes intracelulares de *L. infantum* que la miltefosina. Sin embargo, estos compuestos fueron más tóxicos para las células huésped de mamíferos que la miltefosina, como se demostró por su índice de selectividad (del inglés: *Selective Index* - SI).

Aunque nuestro progreso ha resultado prometedor, aún queda mucho trabajo por hacer. Nuestros próximos pasos se centrarán en la evaluación continua y en la mejora de las propiedades farmacológicas de nuestros compuestos, así como en alcanzar una comprensión más completa de su potencial toxicidad para las células huésped de mamíferos. •

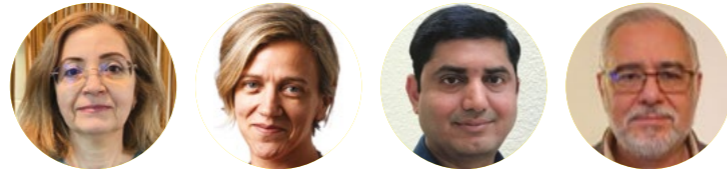
Referencias

- Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V. et al. 6-Br-5methylindirubin-3'-oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 12, p. 1289–1303, 2009.



LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA DE KINETOPLÁSTIDOS, UNA NUEVA OPORTUNIDAD DE TRATAMIENTO PARA EL MANEJO DE LA LEISHMANIASIS

GERHILD ANGYALOSI, NATASHA HOCHBERG y SRINIVASA P S RAO, Novartis y BYRON ARANA, DNDi



Entre las enfermedades tropicales desatendidas (ETD), la leishmaniasis, con todas sus formas clínicas - visceral, cutánea y mucocutánea - es una enfermedad devastadora para los pacientes y representa una carga importante para los sistemas de salud ya sobrecargados. La hoja de ruta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para las enfermedades tropicales desatendidas 2021-2030, a través de su marco estratégico para el control y el manejo integrados de las enfermedades tropicales desatendidas de la piel, ha definido objetivos y estrategias específicos para el control de la leishmaniasis cutánea (LC) en todo el mundo. Además de mejorar la detección, el diagnóstico clínico, la notificación y el tratamiento de los casos de LC detectados en países endémicos, una de las principales acciones identificadas es el desarrollo de nuevos tratamientos orales o tópicos para uso en centros de salud primaria.

DNDi y sus socios colaboran para identificar y promover el desarrollo de tratamientos seguros, eficaces y asequibles para las personas con enfermedades desatendidas, incluidas la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. LXE408 es un nuevo compuesto, descubierto en Novartis con el apoyo financiero de Wellcome (Khare *et al.* 2016). LXE408 es un inhibidor selectivo del proteasoma de kinetoplastidos, el primero de su

clase, y un posible candidato a fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y cutánea, así como de la enfermedad de Chagas (Khare *et al.* 2016).

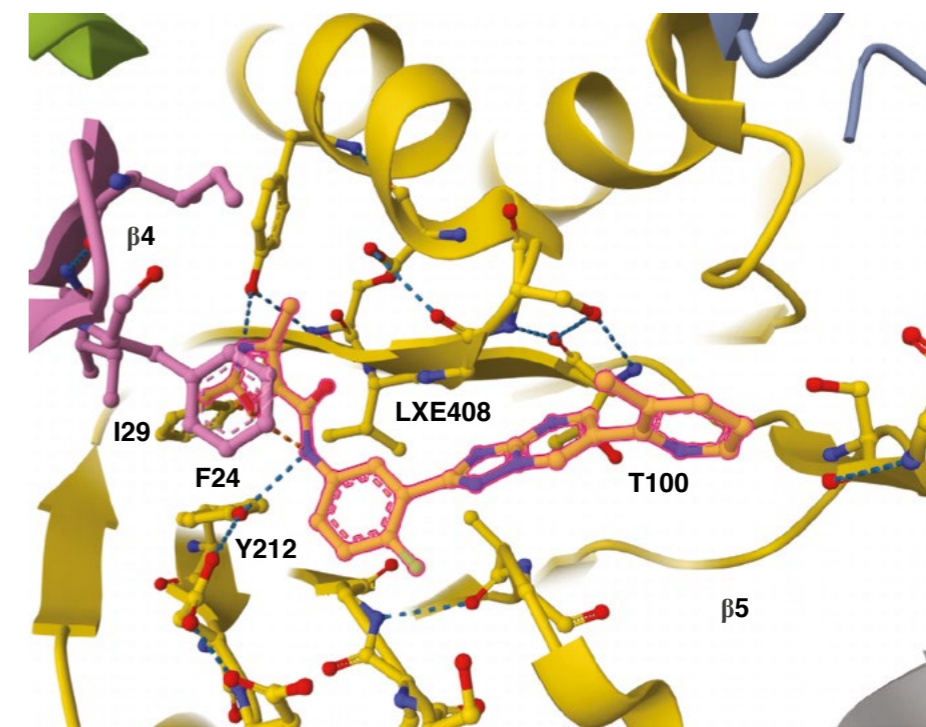
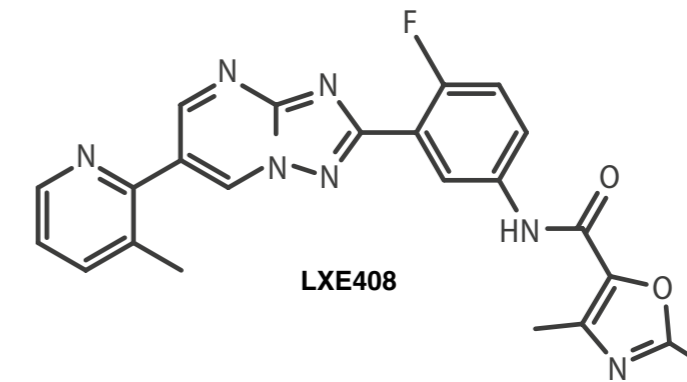
En modelos preclínicos *in vitro*, LXE408 ha demostrado ser altamente selectivo para la inhibición de la actividad similar a la quimotripsina del proteasoma 20S de kinetoplastidos y es potente contra todas las especies de *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi* probadas. Al inhibir la actividad similar a la quimotripsina, LXE408 interactúa selectivamente con subunidades altamente conservadas del proteasoma 20S de kinetoplastidos (subunidades b4 y b5) y no inhibe el proteasoma 20S humano. Por lo tanto, LXE408 tiene el potencial de ser seguro y eficaz en una gran variedad de *Leishmania sp.*, incluyendo *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* y *L. braziliensis*. Además, LXE408 es eficaz en varios modelos *in vivo*, incluida la leishmaniasis visceral (LV) y la leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo: modelo de ratón de LV (*L. donovani*), modelo de supresión de lesiones en ratón (*L. major*), modelo de curación de lesiones en ratón (*L. major*) (Nagle *et al.* 2020).

Las pruebas de seguridad de un estudio de Fase 1 de dosis múltiples ascendentes en voluntarios sanos apoyan la continuación de LXE408 a la Fase 2 (Segal, 2022).

LXE408 se está estudiando actualmente en ensayos clínicos de Fase 2 en leishmaniasis visceral (kala-azar) en India (clinicaltrials.gov NCT05593666) y Etiopía (clinicaltrials.gov NCT05957978), con resultados previstos para 2025. LXE408 tiene el potencial de ser un fármaco oral nuevo para el tratamiento de la LC en todas las zonas endémicas y puede sumarse al arsenal terapéutico existente contra esta enfermedad debilitante. Sobre la base de la experiencia adquirida en los estudios de LV, DNDi y Novartis están colaborando para avanzar en el desarrollo de LXE408 también en la leishmaniasis cutánea.

Frente a una enfermedad compleja como la LC, con una heterogeneidad sustancial en sus manifestaciones clínicas y una gran diversidad de parásitos, el desarrollo de metodologías de ensayo clínico armonizadas es fundamental (Olliaro *et al.* 2018). La red de investigación clínica redLeish es un recurso valioso con capacidades para la evaluación clínica a través de una serie de sitios. Aprovechando la experiencia científica y las plataformas de investigación existentes, el desarrollo exitoso de un nuevo recurso prometedor se beneficiará aún más de un enfoque de colaboración integrado de todas las partes interesadas con asociaciones innovadoras entre los sectores público y privado. •

Estructura crio-EM de alta resolución del proteasoma 20S de *L. tarentolae* en complejo con LXE408



Referencias

- Khare S, Nagle AS, Biggart A, *et al.* (2016) Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*; 537(7619):229-233.
- Nagle AS, Biggart A, Be C, *et al.* (2020) Discovery and characterization of clinical candidate LXE408 as a kinetoplastid-selective proteasome inhibitor for the treatment of leishmaniasis. *J Med Chem* 1021/acs.jmedchem.0c00499
- Olliaro P, Grogl M, Boni M. *et al.* (2018) Harmonized clinical trial methodologies for localized cutaneous leishmaniasis and potential for extensive network with capacities for clinical evaluation *PLoS Negl Trop Dis* 12(1): e0006141. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006141>
- Segal F, *et al.* Oral presentation at WorldLeish7, Cartagena, Colombia, August 2, 2022
- A Phase II, Multicentre, Randomized, Two-arm Blinded Study to Assess the Efficacy and Safety of Two LXE408 Regimens for Treatment of Patients With Primary Visceral Leishmaniasis. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05593666> (accessed 29 Jan 2024).
- LXE408 for Treatment of Visceral Leishmaniasis in Ethiopia, a Proof of Concept Study. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05957978> (accessed 29 Jan 2024).





ATI-1801 DE APPILI THERAPEUTICS: HACIA UN TRATAMIENTO SEGURO Y EFICAZ PARA LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA

DONALD CILLA, GARY NABORS, CARL GELHAUS, ARTHUR BARON y JETSUDA AREEPHONG, Appili Therapeutics Inc y MENA ABDEL-NOUR, Appili Therapeutics Inc y Bloom Burton & Co



La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma más común de leishmaniasis y afecta a cientos de miles de personas en todo el mundo. La LC causa lesiones cutáneas dolorosas que pueden persistir durante meses o años y está asociada a un importante estigma social debido a las cicatrices y desfiguraciones que la enfermedad suele causar. Desafortunadamente, las terapias actuales para el tratamiento de la LC, aunque moderadamente eficaces, son invasivas, tóxicas y pueden requerir hospitalización para su administración. Además, los métodos principales de tratamiento de la LC son inyectables, como la anfotericina B, los antimoniales pentavalentes, que son dolorosos cuando se administran, y la miltefosina oral, que es cara y no permite el acceso a los pacientes de los países en desarrollo que la necesitan.

Está claro que se necesitan tratamientos más seguros y fáciles de ad-

ministrar para la LC. Una solución sencilla es una crema tópica que podría reducir la exposición sistémica al fármaco a la vez que trataría directamente las lesiones de LC. Las cremas tópicas tienen la doble ventaja de limitar el potencial de toxicidad y de ser autoadministrables, en lugar de requerir inyecciones diarias administradas por personal médico cualificado.

Appili Therapeutics está trabajando para llevar una de esas soluciones, una crema tópica de paromomicina (ATI-1801) a los pacientes con LC. Appili adquirió ATI-1801 de la U.S. Army Medical Materiel Development Activity (USAMMDA) en 2019. En el momento de la adquisición, USAMMDA había finalizado un programa de desarrollo clínico completo que incluía estudios de seguridad de Fase 1 que demostraban la tolerabilidad, y estudios de eficacia de Fase 2 en Colombia, Francia y Túnez, que mostraron superioridad al placebo. Otros estudios de Fase 2 realizados en Perú y Panamá demostraron que el ATI-1801 tenía una eficacia comparable a la de una crema combinada de paromomicina y gentamicina. Los estudios de eficacia de Fase 3 se realizaron con 399 pacientes en Panamá y 375 pacientes en Túnez y demostraron una tasa de curación clínica del 77,8% y el 82% respectivamente. Estos estudios sugirieron que el ATI-1801 sería eficaz en el tratamiento tanto de la

LC del Viejo Mundo como de la LC del Nuevo Mundo.

El objetivo de Appili es facilitar un amplio acceso al ATI-1801 a los pacientes con LC en todo el mundo. Tenemos previsto trabajar con la Organización Mundial de la Salud (OMS) para incluir el ATI-1801 en el programa de medicamentos esenciales precalificados de la OMS y distribuirlo a los países endémicos que más lo necesiten. Este proceso resulta más sencillo para los productos que han sido aprobados por autoridades reguladoras estrictas, como la FDA.

Appili ha identificado un nuevo fabricante de ATI-1801 y está en proceso de transferirle la tecnología. Dado que hay un nuevo fabricante, Appili está trabajando con la FDA para demostrar la consistencia del producto de este nuevo fabricante con el del fabricante anterior. Esto puede implicar experimentos *in vitro* y/o estudios clínicos para cualificar al nuevo fabricante. En todos los escenarios, Appili está buscando colaboraciones y fuentes de financiación para apoyar el desarrollo avanzado del producto.

Una vez que la FDA apruebe el ATI-1801, Appili trabajará con la OMS para distribuirlo en zonas endémicas de LC en colaboración con ONGs, ministerios de salud locales y empresas farmacéuticas, llevando así un tratamiento seguro y eficaz para la LC a quienes lo necesitan. •

DIRECTRICES DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN LAS AMÉRICAS

OTACILIO C. MOREIRA, Plataforma de Análisis Molecular, Laboratorio de Virología y Parasitología Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundación Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, ANA NILCE SILVEIRA ELKHOURY, Organización Panamericana de la Salud, Rio de Janeiro, Brasil y ELISA CUPOLILLO, Laboratorio de Investigación en Leishmaniasis, Instituto Oswaldo Cruz, Fundación Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil



La leishmaniasis cutánea (LC) es la manifestación más prevalente de las leishmaniasis, con un polimorfismo clínico que va desde la presencia de pápulas hasta úlceras múltiples que afectan tanto a la piel como a las mucosas, provocando cicatrices permanentes y graves discapacidades. Esta enfermedad, marcada por su carácter desfigurante y estigmatizante, suele tener un impacto psicosocial y económico en las comunidades afectadas.

En 2022, se notificaron más de 35.000 casos de LC en las Américas, de los cuales más del 60% se concentraron en Brasil, Colombia y Perú. A pesar de una tendencia a la disminución del número de casos en los últimos 20 años, en 2022 hubo un aumento en la

incidencia de la enfermedad en comparación con el año anterior (OPS, 2023).

El diagnóstico ha surgido como uno de los principales retos para el control efectivo de la enfermedad como problema de salud pública. La disponibilidad de herramientas de diagnóstico para la LC es crucial para alcanzar los objetivos establecidos en la Hoja de Ruta de la OMS para las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) de 2021 a 2030, que establece la detección del 85% de todos los casos de LC, seguida del tratamiento del 95% de los casos notificados (OMS, 2020).

En 2022, hubo una mejora en el diagnóstico de LC y de leishmaniasis mucosa en la región de las Américas, con un 86,2% de los casos diagnosticados

por métodos de laboratorio, lo que representa un 7% más que el año anterior (OPS, 2023). En este contexto, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) lidera una iniciativa que incluye centros de investigación de varios países de la región donde la LC es endémica. El objetivo es desarrollar un enfoque consensuado, estandarizado y validado para el diagnóstico parasitológico de la enfermedad mediante la técnica qPCR, superando la baja sensibilidad de los métodos parasitológicos disponibles y ayudando a los distintos países de las Américas a mejorar su capacidad y ampliar el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad. El proyecto cuenta con la colaboración de siete grupos de Argentina, Bolivia, México, Panamá, Perú y dos de Brasil. »





Reunión con expertos:
Definición de la qPCR como enfoque para mejorar el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea en las Américas

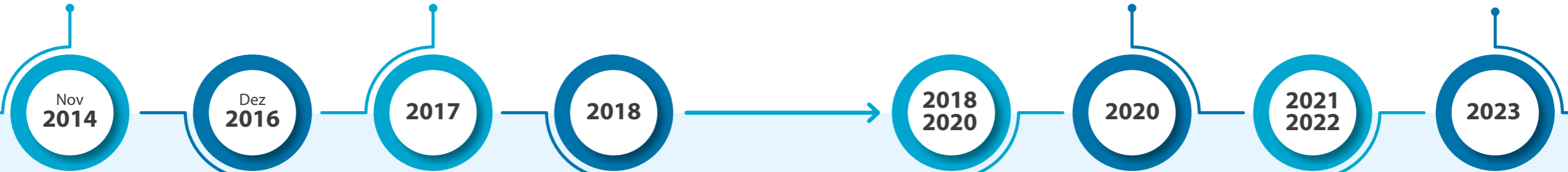
Planificación de actividades y estandarización de ensayos moleculares

Transporte de las muestras al Laboratorio Central (Fiocruz-RJ) e inicio de la validación multicéntrica de los ensayos de qPCR

Análisis final de los resultados y establecimiento de la metodología de consenso para el diagnóstico molecular de la leishmaniasis cutánea en las Américas

II Taller Internacional sobre la Estandarización de un ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga parasitaria para el manejo de la leishmaniasis cutánea en las Américas: Fiocruz RJ

Creación de un panel de muestras, envío a todos los laboratorios participantes y devolución de los resultados



Nov 2014

Dez 2016

2017

2018

2018 2020

2020

2021 2022

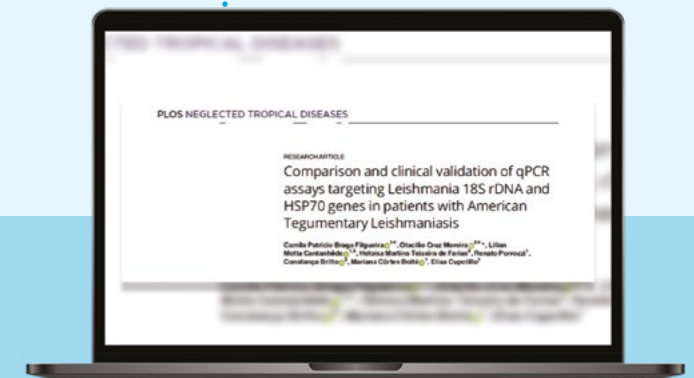
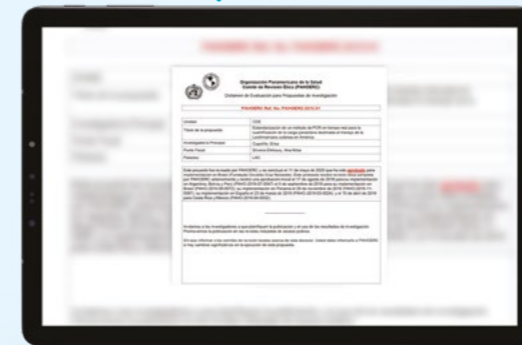
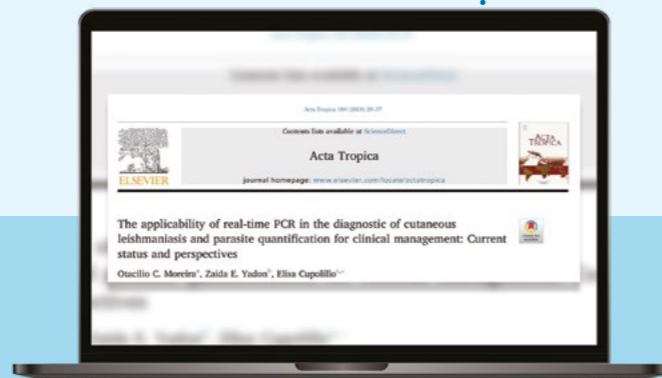
2023

I Taller Internacional sobre la Estandarización de un ensayo PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga parasitaria para el manejo de la leishmaniasis cutánea en las Américas: Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia

Revisión de los métodos moleculares utilizados como herramienta para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea

Sometimiento/Aprobación del Proyecto por el Comité de Ética de la PAHOERC y comités locales

Validación analítica y validación clínica preliminar de la qPCR 18SrADN y la qPCR HSP70 para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea





Desde que se demostró la eficacia de la PCR en el diagnóstico de la LC, se han sugerido y experimentado diversos enfoques metodológicos, tanto con PCR convencional (cPCR) como con PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Sin embargo, ésta es la primera iniciativa para estandarizar y validar una metodología específica para el diagnóstico de la enfermedad, lo que permite definir un consenso sobre protocolos y blancos moleculares que puedan utilizarse de forma mejor para respaldar el diagnóstico clínico.

Los ensayos de qPCR fueron estandarizados por Fiocruz, Rio de Janeiro (Laboratorio Central), utilizando ADN extraído de promastigotes de diversas especies de *Leishmania*, seguido de una validación clínica preliminar. Esta validación se realizó en muestras recolectadas de pacientes con sospecha clínica de LC, con o sin confirmación del diagnóstico parasitológico. Se realizaron ensayos qPCR multiplex dirigidos a la ARNasa P humana (control interno endógeno), 18S rADN y hsp70 en el parásito. Se observó una correlación significativa en la cuantificación del parásito entre los dos blancos utilizados. Al considerar el examen microscópico como la referencia estándar para el diagnóstico parasitológico, los resultados de los dos ensayos simultáneos de qPCR mostraron una sensibilidad del 98,5%. Además, al analizar secuencialmente los resultados de la qPCR para 18S rADN y luego la qPCR para hsp70, se obtuvo una especificidad máxima (100%) (Filgueira *et al.* 2020).

La siguiente etapa fue la validación clínica multicéntrica utilizando la metodología estandarizada para tres blancos de *Leishmania* spp: hsp70, 18SrADN y kADN. Cada uno de los

laboratorios participantes recolectó al menos quince muestras de lesiones cutáneas de pacientes con LC, lo que supuso un total de 128 muestras. El ADN de cada muestra se extrajo en condiciones estandarizadas, utilizando un control interno exógeno, y se envió a ciegas al Laboratorio Central, donde se sometió a ensayos de qPCR. Los resultados mostraron una positividad que oscilaba entre el 67-100% y el 80-100% para los blancos hsp70 y 18SrADN, respectivamente. Los ensayos de kADN mostraron aproximadamente un 30% de positividad para las muestras de México, lo que plantea algunas posibilidades que indican la limitación de utilizar este blanco para toda la región, debido a su heterogeneidad entre las especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. La mejor sensibilidad se obtuvo para el blanco 18SrADN, que se consideró casi perfecta. Se obtuvo una especificidad del 100% para este blanco y también para la hsp70. Se produjo un descenso de la positividad de la qPCR para las muestras con Ct para la ARNasa P a partir de 28, lo que indica que, además de actuar como control endógeno para la reacción, el resultado de la ARNasa P permite una mejor interpretación de los resultados obtenidos para los blancos de *Leishmania* spp.

A continuación, se construyó un panel de 68 muestras a partir de las muestras enviadas por los distintos grupos participantes y de muestras de referencia, que se envió a ciegas a cada grupo para realizar las pruebas. Los resultados mostraron una buena reproducibilidad en comparación con los resultados obtenidos por el Laboratorio Central. En general, hubo una buena correlación y concordancia entre la carga parasitaria determinada por el Laboratorio Central y los demás laboratorios participantes.

Tras un esfuerzo de 9 años, los resultados fueron presentados y discutidos durante el II Taller Internacional sobre la Estandarización de un ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga parasitaria para el manejo de la leishmaniasis cutánea en las Américas, al que asistieron especialistas de los seis países participantes en la iniciativa. Todos tuvieron la oportunidad de llevar a cabo los protocolos durante el taller para poder aclarar cualquier duda. Al final, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, el grupo consideró unánimemente que el protocolo qPCR dirigido a la región 18SrADN de *Leishmania* spp debe ser utilizado en el diagnóstico molecular de la LC. Asimismo, otros estudios indican que este protocolo puede aplicarse en el diagnóstico de las diversas manifestaciones clínicas de la LC y podría ser una herramienta importante para el diagnóstico de la LM.

Para completar el estudio, se están evaluando muestras de lesiones cutáneas de otras etiologías con el fin de mejorar la evaluación de la especificidad de las pruebas. Los resultados se están organizando para su publicación en una revista científica. Por tratarse de la única metodología validada para el diagnóstico molecular de la LC en las Américas, se ha elaborado un informe técnico con la metodología detallada para ponerla a disposición de los laboratorios nacionales e incorporar el protocolo al flujo de diagnóstico de laboratorio de la LC en los diferentes países de la región.

Todas las actividades científicas y técnicas están siendo coordinadas por el Laboratorio de Investigación en Leishmaniasis y la Plataforma de Análisis Moleculares - Laboratorio de Virología y Parasitología Molecular, Fundación Oswaldo Cruz, Brasil, con el apoyo de la OPS y la DNDi. •

Referencias

Pan American Health Organization. Leishmaniases: Epidemiological Report on the Region of the Americas. No. 12, December 2023. Washington, D.C.: OPS; 2023. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>

World Health Organization. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva, 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>

Filgueira CPB, Moreira OC, Cantanhêde LM, de Farias HMT, Porrozzi R, Britto C, *et al.* (2020) Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 14(10): e0008750. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008750>



AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN EL PUNTO DE ATENCIÓN PARA LAS ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS CUTÁNEAS

DR SUNDEEP CHAITANYA VEDITHI,
American Leprosy Missions & University of Cambridge



American Leprosy Missions (ALM) es una organización internacional comprometida con aliviar el impacto de las Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD), conocidas por causar discapacidades y complicaciones crónicas. La misión de ALM abarca no sólo la curación física, sino también el restablecimiento de la dignidad y la esperanza de las personas afectadas. La organización lidera el desarrollo y la inversión en proyectos, sistemas, tecnologías y herramientas innovadoras destinadas a fomentar un cambio sostenible y positivo y acelerar el descubrimiento y la aplicación de soluciones pioneras para el tratamiento, la atención y la eventual erradicación de las ETD de alta morbilidad.

En 2019, se estableció una asociación fundamental entre ALM y Biomeme Inc. Esta colaboración se originó cuando el director de Investigación e Innovaciones de ALM asistió a la Conferencia de Micobacteriología en Colorado State University, donde se exploró el potencial de la tecnología de Biomeme para detectar infecciones por micobacterias. En consecuencia, ALM y Biomeme Inc. firmaron un acuerdo de biodesarrollo y reparto de ingresos para investigar y desarrollar diagnósticos moleculares para las ETD basados en la qPCR que sean más económicos, fáciles de aplicar en el campo y basados en el punto de necesidad, adecuados para el uso en hospitales y centros de diagnóstico en países tropicales con prevalencia de ETD. Hasta 2020, ALM,

en colaboración con el Centro de Investigación Colaborativa de Kumasi (Ghana), el Instituto Schieffelin de Investigación sobre la Lepra (India) y Colorado State University (EE.UU.), habían desarrollado ensayos moleculares independientes capaces de detectar la úlcera de Buruli (UB) o la lepra en aislados clínicos.

El sistema qPCR Franklin™ de Biomeme representa un avance significativo en el diagnóstico molecular. Este sistema compatible con el campo, económicos y rápido, funciona a temperatura ambiente y es ideal para la detección basada en qPCR en tiempo real de ácidos nucleicos de patógenos en los puntos de atención sanitaria. El sistema, que funciona con pilas, incluye reactivos de extracción »



de ADN en un cartucho cerrado, lo que permite una rápida extracción de ácidos nucleicos de muestras de piel, sin riesgo de contaminación cruzada. Los reactivos qPCR premezclados están liofilizados, lo que garantiza un tiempo de conservación estable y prolongado a temperatura ambiente (15-45° C). El proceso desde la muestra hasta el resultado dura aproximadamente una hora y requiere una formación mínima, lo que hace que el diagnóstico sea sencillo, preciso y factible en instalaciones sanitarias remotas. La implementación de estos sistemas de qPCR en establecimientos de salud periféricos de países donde la lepra es endémica es crucial para el diagnóstico de confirmación, dada la disminución de la experiencia clínica en lepra. Los estudios preliminares de prueba de concepto del Biome Leprosy Assay, realizados con socios en India, Tanzania y EE.UU., demostraron una sensibilidad superior al 95% para la lepra paucibacilar y multibacilar y una especificidad de >99%. Actualmente pretendemos llevar a cabo una evaluación multicéntrica del desempeño de estos ensayos qPCR de Biome para la lepra con el fin de confirmar su eficacia y probar la viabilidad de su aplicación en la periferia del sistema sanitario. Los ensayos Biome para la úlcera de Buruli han superado el desempeño de los sistemas qPCR estándar en los laboratorios de diagnóstico de referencia, y se están realizando evaluaciones de los ensayos para la lepra.

Los resultados iniciales revelan una sensibilidad del 98% en la detección de ADN bacteriano estándar a partir de tan sólo tres células bacterianas en muestras de tejido de raspado cutáneo para la lepra, y una sensibilidad del 95% para la UB, manteniendo una especificidad del 100% para ambos ensayos. Este desempeño se atribuye a la

selección de genes específicos de patógenos, como se detalla en la literatura publicada. Un enfoque similar se implementó con éxito en Ghana para el diagnóstico de Covid-19 durante 2020 y 2021, utilizando ensayos qPCR de Biome en instalaciones de diagnóstico móviles, demostrando ser eficaces en la ampliación de la cobertura para la detección y referencia. ALM facilitó el suministro de máquinas qPCR y reactivos para esta iniciativa.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETD cutáneas son la tercera causa de enfermedad en todo el mundo y se encuentran entre las diez primeras causas de discapacidad. Requieren enfoques similares de detección y manejo, y el diagnóstico molecular es crucial para identificar cinco enfermedades: lepra, úlcera de Buruli, pian, leishmaniasis dérmica y micetoma. Con financiación de la Fundación Anesvad y la Fundación Raoul Follereau, ALM utilizará ahora su experiencia en el desarrollo de ensayos de diagnóstico para crear un ensayo multiplex para la detección simultánea de estas cinco ETD cutáneas utilizando el sistema Biome.

Laboratorios de investigación y centros de diagnóstico de referencia seleccionados de Benín, Camerún, Costa de Marfil, Ghana, Sudán, España y Países Bajos desarrollarán y evaluarán los ensayos de Biome Multiplex para las ETD cutáneas. Muchos de estos países son endémicos para estas ETD cutáneas específicas, y varios de los laboratorios forman parte de la Red de Laboratorios de ETD Cutáneas (Skin NTD LAB-NET), un consorcio de laboratorios principalmente de países de África Occidental fundado por la OMS y financiado por ALM, Anesvad y la Fundación Raoul Follereau. Coordinada por el Centro Pasteur de Camerún como laboratorio asociado, esta red supervisa el

programa de Evaluación Externa de la Calidad (EQA) para el diagnóstico de la UB y del pian en los laboratorios miembros. Garantiza la recopilación, cotejo y difusión oportuna de los resultados a hospitales, programas nacionales, ministerios de salud y pacientes, ejemplificando el compromiso de ALM con la mejora de las capacidades diagnósticas y de los resultados sanitarios en regiones afectadas por ETD.

Para el desarrollo y la evaluación de los ensayos Biome para *Leishmania* utilizando cebadores y sondas específicos del género, hemos colaborado con la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas del Centro Nacional de Microbiología - Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) de España. Como Laboratorio Nacional de Referencia para las infecciones por *Leishmania*, el ISC-III tiene la responsabilidad de apoyar al Sistema Nacional de Salud español en el control de las infecciones por *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*. Este centro está especializado en el diagnóstico y análisis de la respuesta inmune a la leishmaniasis canina tanto natural como experimental. Ha dedicado esfuerzos a desarrollar un modelo de infección experimental en perros, utilizado con éxito en la evaluación de antígenos de *Leishmania* y en ensayos de laboratorio de vacunas contra la leishmaniasis canina. El ISC-III desarrollará ensayos Biome específicos del género de *Leishmania* y, posteriormente, brindará apoyo al Noguchi Memorial Institute for Medical Research de Accra (Ghana) para llevar a cabo su validación analítica y clínica. Además, el ISC-III contribuirá potencialmente al desarrollo de ensayos qPCR Biome Multiplex específicos para las especies de *Leishmania*, adaptados a diferentes geografías. Esta tarea se llevará a cabo además de los ensayos multiplex para ETD cutáneas anteriormente mencionados. •

FORMALIZACIÓN DE LA ASOCIACIÓN BRASILEÑA DE PACIENTES AFECTADOS POR LEISHMANIASIS - ABRAPLEISH

ALEX LAGO, TANIELE CUSTÓDIO, ELY AMORA, ANA PAULA FERREIRA, ABRAPLEISH



Las leishmaniasis son causadas por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por flebótomos, que incluyen más de 20 especies. Es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, que afecta a miles de personas en diversas regiones del mundo. La enfermedad se divide en dos formas clínicas: la leishmaniasis cutánea y la leishmaniasis visceral, que afectan principalmente a las personas más vulnerables desde el punto de vista socioeconómico.

La Asociación Brasileña de Pacientes Afectados por Leishmaniasis (ABRAPLEISH) se creó con el objetivo de luchar por condiciones necesarias para personas afectadas por leishmaniasis, que a menudo viven en comunidades desatendidas y cuyo acceso a la atención sanitaria es precario y limitado por las

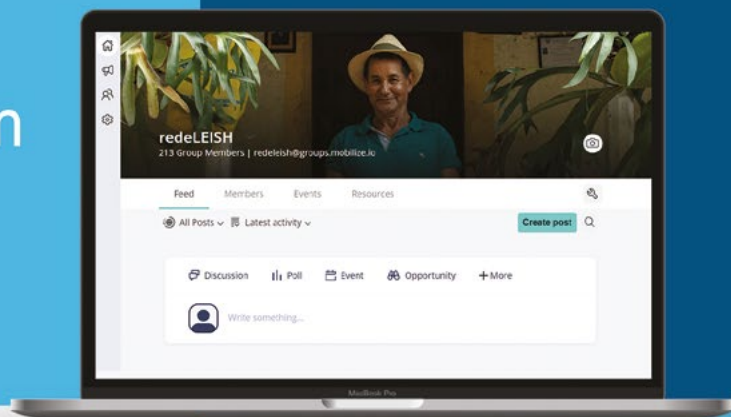
autoridades públicas. La asociación pretende movilizar a las organizaciones para que ofrezcan una buena acogida a las personas afectadas por la enfermedad. La mayoría de los centros de salud no ofrecen un tratamiento, un diagnóstico o una asistencia social excelentes. Ante toda esta negligencia de los poderes públicos en la atención a las personas afectadas por la leishmaniasis, el grupo de investigación ECLIPSE, del Instituto de Salud Colectiva (ISC) de la Universidad Federal de Bahia (UFBA), ha estado trabajando en la zona endémica de leishmaniasis de Bahia. Se trata de una importante zona endémica, donde cada año se registran más de 2.000 casos de leishmaniasis tegumentaria. Así, en colaboración con la DNDi, surgió la idea de invitar a personas de la comunidad a crear una asociación.

El consultor regional de acceso de la DNDi, Diogo Galvão, estuvo presente en la zona de Bahia donde la leishmaniasis es endémica y habló con varias personas de la comunidad afectadas directa o indirectamente por la enfermedad. Les explicó la importancia de revitalizar esta asociación y su impacto en la esfera pública, por lo que algunas personas de la comunidad aceptaron. A lo largo de unos meses, se celebraron reuniones en línea para detallar mejor el proceso de refundación de la asociación de leishmaniasis, creada en 2018 por Moacir Antonio Zini, que nos dejó en 2020. Durante este proceso, algunas personas fueron invitadas a participar en eventos, como el Foro de Enfermedades Desatendidas celebrado en Salvador-Ba en 2023. Durante estos eventos, nos dimos cuenta de la importancia y la magnitud de una asociación en los movimientos sociales. Desde entonces, nos hemos ido fortaleciendo poco a poco para poder luchar y conseguir mejoras para las personas que siguen desatendidas por los poderes públicos.

Así pudimos empezar la formalización de la asociación con el apoyo de DNDi, ECLIPSE y grupos de otras asociaciones de enfermedades desatendidas de Brasil. En el 14 de noviembre de 2023, los miembros de la asociación Alex Lago, Taniele Custódio, Ana Paula Ferreira, Ely Amora y otras personas de la comunidad firmaron el Acta de la asociación ABRAPLEISH, celebrada en la localidad de Presidente Tancredo Neves/Povoado Corte de Pedra-Bahia, Bairro Próspero Cardoso, Rua 7 de Setembro S/N, código postal 4541600. •



¡Únete al Webforum de la redLEISH!



Ingresa a la plataforma en línea con **expertos de toda América Latina** para recibir y compartir **informaciones sobre investigaciones en leishmaniasis**

El foro funciona como una red social en la que también puedes recibir actualizaciones por correo electrónico. Sus miembros pueden interactuar y publicar noticias, facilitando la comunicación entre colaboradores. De esta forma fomentamos el intercambio de documentos y artículos científicos, la divulgación de eventos, el debate, la posibilidad de aclarar dudas y hacer nuevos contactos.

Regístrate por el código QR



o accede al enlace tinyurl.com/3sncc9z9

EXPEDIENTE

Consejo editorial:

Byron Arana, Joelle Rode y Marina Certo

Coordinación:

Joelle Rode

Producción:

Marina Certo

Traducción:

Lítero Traduções

Revisión:

Carolina Alfaro, Joelle Rode, Karla Menezes y Marina Certo

Fotos:

Appili Therapeutics Inc, American Leprosy Missions, Vinicius Berger-DNDi, ABRAPLEISH

Diseño gráfico:

Alerta!design



DNDi América Latina

Rua São José, 70, sala 601- CEP 20010-020 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Tel: +55 21 2529-0400 | www.dndial.org

Sede DNDi

15 Chemin Camille-Vidart 1202 - Ginebra - Suiza
Tel: +41 22 906 9230 | Fax: +41 22 906 9231 | www.dndi.org