



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

ISRAEL ALVARO MARTINIANO SANTANA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES
ORTÓLOGAS DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* COM
POTENCIAL PARA APLICAÇÃO SOROLÓGICA NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Recife
2024

ISRAEL ALVARO MARTINIANO SANTANA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES
ORTÓLOGAS DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* COM
POTENCIAL PARA APLICAÇÃO SOROLÓGICA NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo
Neto

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santana, Israel Alvaro Martiniano .

Avaliação in silico de proteínas recombinantes ortólogas de *Leishmania braziliensis* com potencial para aplicação sorológica na Leishmaniose Tegumentar / Israel Alvaro Martiniano Santana. - Recife, 2024.
54 : il., tab.

Orientador(a): Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador(a): Hemilly Rayanne Ferreira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Antígeno. 2. Conservação. 3. Epítomos. 4. Ortologia. 5. Sorodiagnóstico. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de . (Orientação). II. Silva, Hemilly Rayanne Ferreira da. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

ISRAEL ALVARO MARTINIANO SANTANA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES
ORTÓLOGAS DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* COM
POTENCIAL PARA APLICAÇÃO SOROLÓGICA NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ – PE / Departamento de Microbiologia

Msc. Allana Maria de Souza Pereira
Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ – PE / Departamento de Imunologia

Dra. Ludmila Arruda de Assis Aussourd
Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ – PE / Departamento de Parasitologia

Dedico este trabalho aquele em que os seus olhos testemunharam apenas o início dessa jornada, mas sua presença e legado continuam a guiar os meus passos, meu avô, José Martiniano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me capacitou, guiou e me fez forte durante toda a trajetória para concluir o curso de Biomedicina. Sou grato por esse momento ser a realização de uma promessa e o fruto das minhas orações.

Agradeço a minha família por acreditar nos meus sonhos, apoiar e investir em meio a todas as adversidades, essa conquista só é possível devido ao suporte de anos que recebi tanto em estudos quanto emocionalmente. Em especial, agradeço a minha mãe Nanci Martiniano, minha avó Josefa Rodrigues, meu avó José Martiniano (*in memorian*), aos meus tios Almir, André e Israel, minha tia Nilzete Martiniano e minha prima Thafinis Rodrigues, os quais choraram o meu choro e celebraram as minhas conquistas, me proporcionando o maior amor do mundo. O biomédico Israel Alvaro carrega uma parte de cada um deles, que seguem sendo a maior motivação e inspiração na vida.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio pela confiabilidade na execução desse projeto, por todo suporte, atenção e ensinamento ímpar, que evidencia o grande e admirável pesquisador que é.

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Hemilly Rayanne, a qual tenho imensa admiração pela ciência de qualidade que executa de forma ímpar e por toda parceria única, especial e essencial para minha formação profissional. Seu direcionamento, os conselhos e motivações me permitiram concluir esta etapa com segurança e destinado a contribuir ainda mais com a ciência nacional.

Agradeço aos meus amigos de faculdade, Bruna Maria, Bruna Queiroz, César, Francielle, Jonathan, Roberto, Samara e Tayzes por todas as noites em claro estudando juntos antes das avaliações, por todo suporte emocional, lealdade e confiança. Juntos construímos e vivenciamos os nossos sonhos, alcançamos lugares que um dia foram os pedidos de nossas orações e finalizamos esta etapa lado a lado, com a convicção de que estamos diante de uma carreira brilhante na biomedicina.

Agradeço às minhas amigas de longa data, Gabriela, Maria Alice, Yasmin e Yohanna por todo incentivo na vida acadêmica, apoio emocional e por me apresentarem na

prática o real sentido e valor da amizade. Se cheguei até o presente momento, foi porque estiveram comigo em momentos difíceis e essenciais, contribuindo na minha formação profissional e pessoal.

Agradeço as biomédicas Fernanda Pacífico, Luciana Rezende e Veridiana Sales, aos farmacêuticos Naila Veras e Osmário Tavares, ao biólogo Eduardo Ribeiro e aos técnicos Fábio, Vanessa, Dayse e Roseane pelo ensinamento ímpar, confiança, paciência e compreensão, fundamental ao meu crescimento profissional. Fui privilegiado por acompanhar de perto esses grandes profissionais, que executam um serviço com maestria no Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, contribuindo diariamente para a qualidade e referência do PROLAB.

**“Há tempo para todo propósito debaixo do
céu” - Eclesiastes 3:1**

SANTANA, I.A.M. Avaliação *in silico* de proteínas recombinantes ortólogas de *Leishmania braziliensis* com potencial para aplicação sorológica na Leishmaniose Tegumentar. 2024. 54. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas provocadas por parasitas do gênero *Leishmania* que, dependendo da espécie, ocasionam manifestações clínicas distintas, do tipo tegumentar ou visceral. A *Leishmania braziliensis* é o agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar (LT) do novo mundo, com múltiplos registros de casos em todas as Américas. A falta de um diagnóstico rápido e preciso para a LT ressalta a necessidade urgente de novos métodos diagnósticos que possam fornecer resultados confiáveis sem depender de um conjunto complexo de metodologias. Como uma alternativa promissora, o uso de proteínas recombinantes vem sendo explorado para o desenvolvimento de testes rápidos no diagnóstico de várias doenças, incluindo a LT. Estudos têm mostrado resultados significativos, destacando o potencial dessas proteínas na melhoria da precisão e rapidez dos diagnósticos. Dessa forma, o presente estudo visa avaliar ortólogos de *L. braziliensis* de proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* avaliadas como alternativas para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral. Logo, foi construído um painel com oito proteínas recombinantes (Lci2, Lci3, Lci5, Lci6, Lci7, Lci9, Lci11 e Lci13), identificadas em estudos que antecedem o presente trabalho. A busca por seus ortólogos foi realizada *in silico* seguida de análises comparativas das sequências e a predição de epítomos para células B e para MHC de classe II. Proteínas ortólogas aos antígenos Lci2 e Lci3 apresentaram conservação entre seus domínios, porém com seus motivos repetitivos diferindo das sequências de *L. infantum* e apontando a possibilidade de um elevado repertório antigênico. Já as ortólogas das Lci5 e Lci6 apresentaram domínios e motivos conservados, equivalentes as sequências de *L. infantum*, e baixo repertório antigênico. Também, as proteínas ortólogas Lci7, Lci11 e Lci13 exibiram sequências conservadas e similares as de *L. infantum*, corroborando um potencial para reatividade cruzada com LV. Já a Lci9 não apresentou ortologia para *L. braziliensis*. Em uma segunda análise, a predição de epítomos para os ortólogos de Lci2 e Lci3, exibiram percentuais relevantes indicando regiões potentes ao reconhecimento de anticorpos por células B e células para MHC II. Dessa forma, estes ortólogos para *L. braziliensis*, podem ser viáveis se usados para o diagnóstico sorológico da LT.

Palavras-chave: Antígeno. Conservação. Epítomos. Ortologia. Sorodiagnóstico.

SANTANA, I.A.M. *In silico* evaluation of orthologous recombinant protein of *Leishmania braziliensis* with potential for serological application in cutaneous leishmaniasis. 2024. 54. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of infectious diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*, which, depending on the species, cause distinct clinical manifestations, of the tegumentary or visceral type. *Leishmania braziliensis* is the etiological agent of New World Tegumentary Leishmaniasis (TL), with multiple reported cases throughout the Americas. The lack of a rapid and accurate diagnosis for TL highlights the urgent need for new diagnostic methods that can provide reliable results without relying on a complex set of methodologies. As a promising alternative, the use of recombinant proteins has been explored for the development of rapid tests for the diagnosis of several diseases, including TL. Studies have shown significant results, highlighting the potential of these proteins in improving the accuracy and speed of diagnosis. Thus, the present study aims to evaluate *L. braziliensis* orthologs of *Leishmania infantum* recombinant proteins found to be alternatives for the serological diagnosis of the Visceral Leishmaniasis. Therefore, a panel of eight recombinant proteins was selected (Lci2, Lci3, Lci5, Lci6, Lci7, Lci9, Lci11 and Lci13), identified in studies preceding the present work. A search for their orthologs was performed *in silico* with a comparative analysis of their sequences carried out, followed by the prediction for B cells and MHC class II epitopes. In a first analysis, orthologues to the Lci2 and Lci3 antigens showed conservation within their domains, but with their repetitive motifs differing from the *L. infantum* sequences and indicating the possibility of a highly antigenic repertoire. The orthologous proteins Lci5 and Lci6 presented conserved domains and motifs, equivalent to the sequences of *L. infantum*, and a low antigenic repertoire. Also, the orthologous proteins Lci7, Lci11 and Lci13 presented conserved sequences similar to those of *L. infantum*, corroborating a potential for cross-reactivity with LV. Lci9 did not present orthology for *L. braziliensis*. In a second analysis, the prediction of epitopes for the Lci2 and Lci3 orthologs showed relevant percentages indicating potent regions for the recognition of antibodies by B cells and MHC II cells. Thus, their *L. braziliensis* orthologs may be viable to be used for the serological diagnosis of TL.

Key words: Antigen. Conservation. Epitopes. Orthology . Serodiagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fêmea do vetor responsável pela transmissão da leishmaniose tegumentar no Velho e Novo Mundo	16
Figura 2 – Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i>	18
Figura 3 – Número de casos notificados da leishmaniose cutânea, Região das Américas, 2001-2021	19
Figura 4 – Índice de leishmaniose cutânea, Brasil, 2020-2022	20
Figura 5 – Motivos repetitivos em <i>L. braziliensis</i> com ortologia para o antígeno Lci5	33
Figura 6 - Motivos repetitivos em <i>L. braziliensis</i> com ortologia para o antígeno Lci6	34
Figura 7 - Representação esquemática das regiões não repetitivas e regiões com motivos repetitivos em <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i>	36
Figura 8 – Alinhamento par a par entre sequências do antígeno Lci7 <i>L. infantum</i> e ortólogo <i>L. braziliensis</i>	37
Figura 9 – Alinhamento par a par entre sequências do antígeno Lci11 <i>L. infantum</i> e ortólogo <i>L. braziliensis</i>	38
Figura 10 – Alinhamento par a par entre sequências do antígeno Lci13 <i>L. infantum</i> e ortólogo <i>L. braziliensis</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pannel de proteínas recombinantes com seu respectivo ortólogo	30
Tabela 2 – Motivos repetitivos em <i>L. braziliensis</i> com ortologia para o antígeno Lci2	31
Tabela 3 – Motivos repetitivos em <i>L. braziliensis</i> com ortologia para o antígeno Lci3	32
Tabela 4 – Frequência dos motivos repetitivos homólogos entre Lci5 e Lci5b	34
Tabela 5 – Frequência dos motivos repetitivos homólogos entre Lci6 e Lci6b	35
Tabela 6 – Predição de epítomos de células B por ABCpred e epítomos para MHC de classe II por NetMHCII 2.3, para proteína Lci2b ortólogo a Lci2	40
Tabela 7 – Predição de epítomos de células B por ABCpred e epítomos para MHC de classe II por NetMHCII 2.3, para proteína Lci3b ortólogo a Lci3	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAT	Direct agglutination test - Teste de aglutinação direta
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado à enzima
ICT	Immunochromatographic test - Teste imunocromatográfico
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IDSA	Infectious Diseases Society of America - Sociedade de Doenças Infecciosas da América
IFI	Imunofluorescência indireta
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction - reação em cadeia da polimerase
qPCR	Real time Polymerase Chain Reaction - reação em cadeia da polimerase em tempo real
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	18
2.3	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	21
2.3.1	Diagnóstico Molecular	21
2.3.2	Diagnóstico Parasitológico	22
2.3.3	Diagnóstico Sorológico	23
2.4	PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SORODIAGNÓSTICO	24
2.5	ORTOLOGIA E PARALOGIA	25
2.6	FUNDAMENTOS PARA O PRESENTE TRABALHO.....	25
3	OBJETIVOS	
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	
4.1	PAINEL DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	28
4.2	OBTENÇÃO DE ORTÓLOGOS PARA L.BRAZILIENSIS	28
4.3	ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQUÊNCIAS.....	28
4.4	PREDIÇÃO LINEAR DE EPÍTOPOS	29
4.4.1	Predição linear de epítomos para células B	29
4.4.2	Predição linear de epítomos para complexo de histocompatibilidade de classe II	29
5	RESULTADOS	
5.1	Painel de proteínas recombinantes e seus ortólogos.....	30
5.2	Identificação dos ortólogos e análise de motivos repetitivos	31
5.3	Análise de conservação entre sequências por alinhamento par a par	37
5.4	Predição de epítomos	40
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO	46

1 Introdução

Protozoários da família *Trypanosomatidae*, pertencentes ao gênero *Leishmania*, são causadores de um grupo de doenças caracterizadas por sua complexidade e diversidade epidemiológica, alta taxa de morbidade e mortalidade, representando um grande problema de Saúde Pública (PAGNIEZ et al., 2023). Este gênero compreende espécies divididas em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, responsáveis pelas formas distintas de Leishmaniose, como a Leishmaniose Tegumentar Americana ou Cutânea (LT), Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC). No Brasil, a LT é predominantemente causada por *Leishmania braziliensis*, do subgênero *Viannia*, enquanto a LV e LCM apresentam, respectivamente, *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*, ambas do subgênero *Leishmania* como principais representantes (DE VRIES et al., 2022).

O protozoário *Leishmania braziliensis* é conhecido por causar uma infecção emergente e negligenciada. Este parasita tem como reservatórios animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, que desempenham um papel crucial na formação de áreas endêmicas. (MORGADO et al., 2023). No Brasil, está presente no âmbito rural, litorâneo, urbano e florestal, com destaque para região Norte do país, onde concentra o maior número de casos registrados. Sua patogenicidade provoca lesões ulcerativas na superfície corporal, localizada ou difusa, ocasionando uma problemática socioeconômica, visto que o perfil clínico evolutivo pode resultar em deformidade. (VIEIRA et al., 2021).

A endemidade da LT apresenta como fator consolidante a insuficiência no diagnóstico precoce e ativo, devido à baixa sensibilidade no teste padrão ouro para o diagnóstico da doença (GOMES et al., 2014). A sorologia é uma das ferramentas utilizadas no diagnóstico da LT sendo mais viável devido a sua praticidade em execução, baixo custo e fácil alcance a populações endêmicas. Porém, devido aos baixos títulos de anticorpos para detecção da LT, existe uma prevalência de resultados falso-negativos, e reatividade cruzada com outros tripanosomatídeos, como o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de chagas. O Sistema Único de Saúde-SUS, já há bastante tempo, implementou para o diagnóstico da LT a intradermoreação de Montenegro (IDRM), que consiste em uma reação de hipersensibilidade retardada (NASCIMENTO et al., 1993). Atualmente, contudo, este

teste está descontinuado por demonstrar limitações referente a sensibilidade e especificidade, positivando para indivíduos com quadro agudo e crônico, vacinados e expostos anteriormente ao parasita. Também apresenta reatividade cruzada associada a patologias com antígenos estruturalmente semelhantes (SILVA et al., 2007).

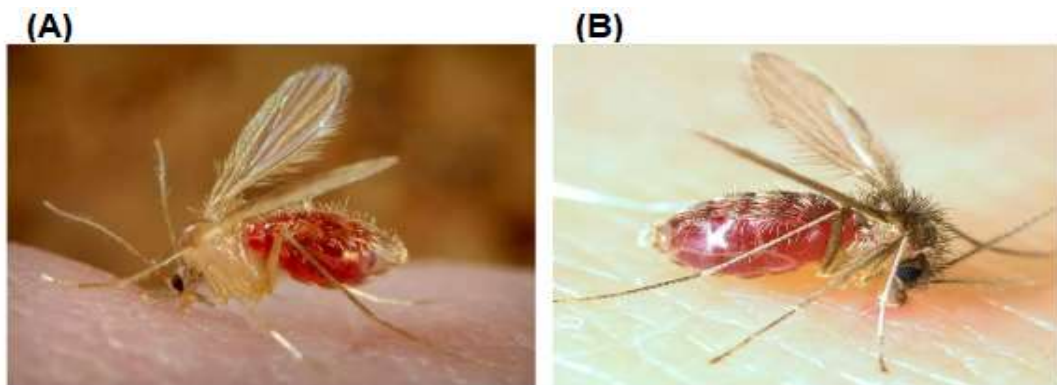
Considerando o cenário atual de insuficiência nos testes para detecção da LT, somado a variedade de espécies que podem apresentar antígenos em comum, tornou-se emergente a pesquisa por novas estratégias de diagnóstico. Estudos que precedem o atual trabalho, identificaram diferentes proteínas recombinantes (Lci2; Lci3, Lci5, Lci12 e Lci13) que apresentaram bom desempenho em ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) associado ao diagnóstico sorológico da LV, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste (OLIVEIRA et al., 2011) (MAGALHÃES et al., 2017). A partir desses resultados, surgiu a ideia em pesquisar ortologia com *L. braziliensis*, buscando antígenos recombinantes para aplicação sorológica da LT. Os resultados sugerem as proteínas ortólogas aos antígenos Lci2 e Lci3 como promissores, por conter motivos repetitivos conservados, distintos de *L. infantum*, e com bom repertório antigênico. Além disso, ambas as proteínas apresentaram epítomos com 100% da capacidade preditiva em reconhecer anticorpos específicos apresentados por MHC de classe II e pequenas variações nos epítomos previstos para células B. Portanto, a obtenção de ortólogos para *L. braziliensis* torna-se viável, uma vez que motivos conservados detectados resultam em sequências proteicas com capacidade de exploração e podem potencializar o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A leishmaniose tegumentar (LT) é considerada uma zoonose ocorrente na interface de seres humanos, animais e meio ambiente (DE, S. et al., 2004). A LT possui como agente causador um protozoário intracelular obrigatório, pertencente à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, que se caracterizam pela presença do cinetoplasto provedor de energia para movimentação do parasita e de microtúbulos rígidos garantindo estruturas bem definidas ao longo do ciclo de vida (WEIGLE et al., 1996). Insetos hematófagos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, encontrado nas Américas e *Phlebotomus* amplamente distribuído no continente Africano, Asiático e Europeu (Figura1), são os vetores responsáveis por comportar e proporcionar o desenvolvimento e transmissão do parasita. Estes insetos pertencem à ordem Díptera; subordem Nematocera; família Psychodidae, e subfamília Phlebotominae, apresentando aparelho bucal curto e adaptado para o repasse sanguíneo, corpo característico por uma pelugem densa, asas em formato de “V” e variação na coloração conforme as espécies (RANGEL et al., 2007).

Figura 1 - Fêmea do vetor responsável pela transmissão da leishmaniose tegumentar no Velho e Novo Mundo.



Legenda: Espécies de flebotomíneos vetores de LT. (A) *Phlebotomus* sp. representante vetorial no Velho mundo. (B) *Lutzomyia* sp. representante vetorial nas Américas.

Fonte: WILSON, Ray. Phlebotomidae. Disponível em:

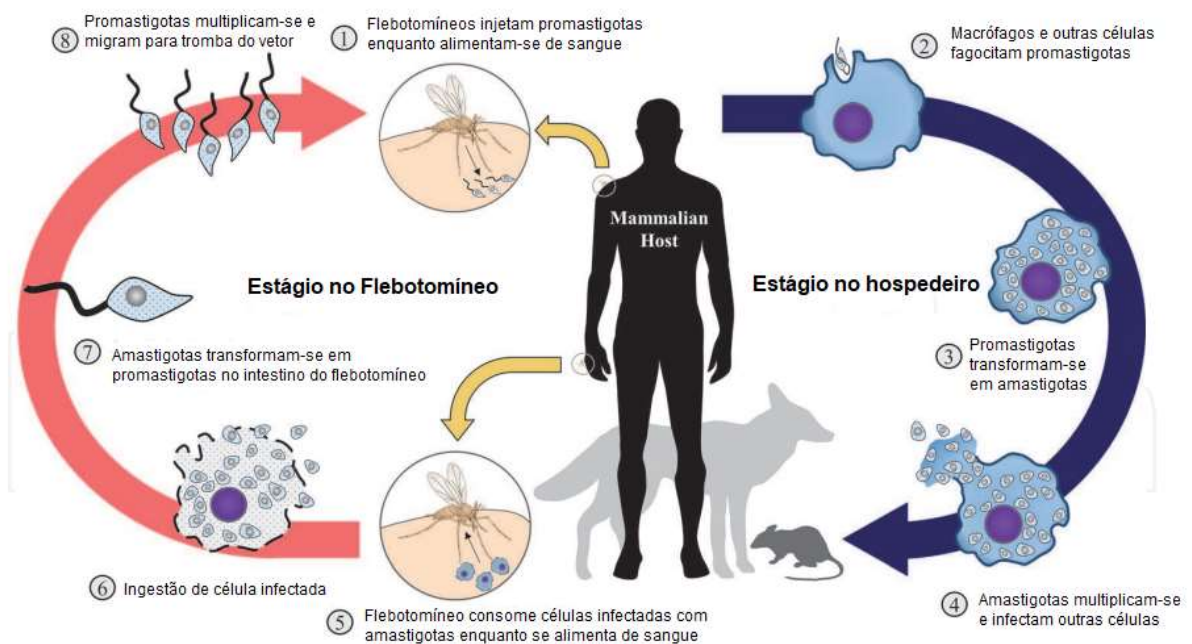
<http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/Diptera/Phlebotomidae.html>.

A LT caracteriza uma doença metaxênica, por possuir durante o ciclo de vida do protozoário, fase de transformação e multiplicação no intestino do vetor. O parasita do gênero *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas: promastigota, morfologia de caráter flagelar, fusiforme, com núcleo central e um cinetoplasto na região anterior, presente em meio extracelular; amastigota com formato esférico ou oval, com núcleo proeminente, ausência de flagelo e presente no meio intracelular em células fagocíticas (MCGWIRE et al., 2014). O processo patológico tem origem quando flebotomíneos fêmeas infectadas realizam repasse sanguíneo ao hospedeiro vertebrado, inoculando promastigotas metacíclicas (Figura 2) (READY 2013). A saliva de vetores como *Lutzomyia longipalpis*, contém potente vasodilatador sendo crucial na imunomodulação das células do sistema imune inato do hospedeiro, promovendo quimiotaxia e interações com macrófagos capazes de impedir a ação efetora desses fagócitos contra o parasita (SILVA et al., 2007). A internalização da *Leishmania* ocorre por interações com receptores na superfície celular, direcionando o protozoário ao vacúolo parasitóforo, no qual, em condições ácidas, inicia o processo de multiplicação, ocasionando rompimento celular e liberando-as para infectar outras células. A infecção dos insetos é ocasionada durante o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados, quando amastigotas são ingeridas pelo hematófago e envolvidas pela matriz peritrófica presente no intestino do inseto, no qual ocorre a transformação em promastigotas delgadas e longas (TEIXEIRA et al., 2013). O processo na migração das formas flageladas, do intestino para porções anteriores ao aparelho digestivo do inseto, torna propício à propagação do ciclo e alcance a novos hospedeiros durante a alimentação desses vetores. (TINOCO-NUNES et al., 2016).

Nacionalmente, sete espécies de *Leishmania* são relatadas como causadoras de LT, sendo elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi*, *L. (Leishmania) amazonensis* (BRITO et al., 2012). Estas espécies diferem entre subgênero, níveis de patogenicidade e distribuição geográfica. O desenvolvimento do parasita no intestino do vetor é crucial para identificação do complexo parasitário e o subgênero de origem. Aqueles pertencentes ao subgênero *Viannia* se desenvolvem na região posterior ao intestino do flebotomíneo, aderidos a parede e apresentando menor patogenicidade quando comparado aos do subgênero *Leishmania*. Estes se caracterizam por

desenvolver-se entre a região anterior e média ao intestino do vetor, sendo responsáveis pelas manifestações clínicas mais graves da LT (DIOTALLEVI et al., 2020). A variação entre diferentes espécies de *Leishmania* apresenta correlação com condições ambientais e epidemiológicas, sendo predominantemente encontradas em regiões específicas do país. Assim, a *L. (V.) guyanensis* é a principal representante da forma mucocutânea da LT no Brasil, especificamente na Região Norte. Já a forma cutânea, por meio da *L. (V.) braziliensis*, é amplamente notificada no território nacional provocando o quadro mais frequente da leishmaniose tegumentar (SIVIERO et al., 2005).

Figura 2 - Ciclo de vida do gênero *Leishmania*.



Legenda: Desenho esquemático do ciclo de vida e infecção por *Leishmania spp.*

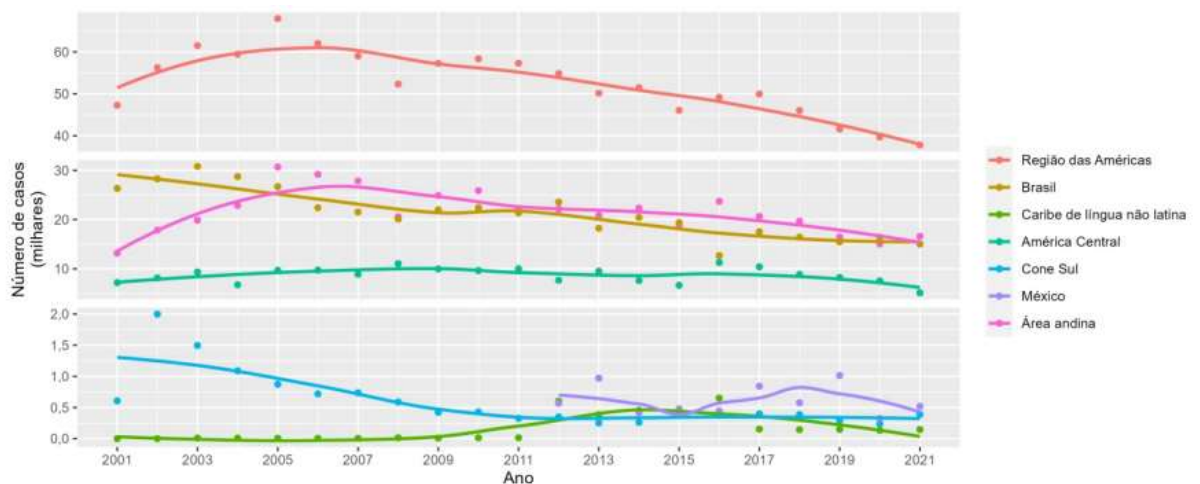
Fonte: Adaptado SHEIKH et al. 2020

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a LT consiste no espectro clínico mais comum entre as leishmanioses, presente no continente Americano, Africano, Asiático e Europeu, com variações entre 600.000 e 1 milhão de novos casos

anualmente (WHO, 2023). Entre os fatores favoráveis a ecoepidemiologia, encontram-se as áreas tropicais e subtropicais, relações socioeconômicas e demográficas, ocasionando comorbidades consideráveis no Norte da África, elevado índice de notificação no Oriente Médio, além do estabelecimento de endemias na Ásia Central e Sudeste Asiático (PIYASIRI et al. 2022). Nas Américas, ou Novo Mundo, 17 países são caracterizados endêmicos para infecção, segundo dados apresentados pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Em um recorte temporal, realizado entre os anos de 2001 e 2021 (Figura 3), foram notificados 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LT) e leishmaniose mucosa (LMC), espectros clínicos da LT, nos quais 37,60% correspondem ao Brasil (OPAS, 2022).

Figura 3 - Número de casos notificados de leishmaniose cutânea, Região das Américas, 2001-2021.



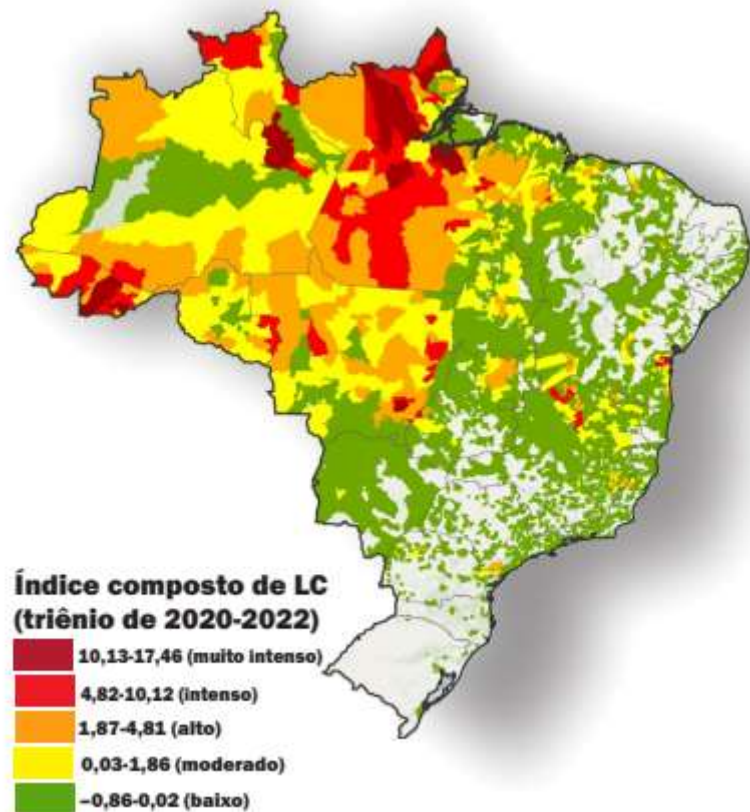
Legenda: Dados notificados pelos programas de leishmanioses e serviços de vigilância de 17 países endêmicos nas Américas. Os pontos marcados no gráfico representam o cômputo real de casos. As linhas correspondem a tendências de curto prazo, calculadas utilizando métodos de regressão local.

Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas (SisLeish). Washington, DC: OPAS; 2022

No território nacional, a incidência da LT é em média 12,97 casos/100.000 habitantes, que correspondem a LC e LMC, 94% e 6%, respectivamente (OPAS,2023). A região Norte do país é relatada como a maior problemática em

relação ao registro anual em número de casos (Figura 4), apresentando condições ideais à persistência de focos ativos em matas remanescentes, agravado pela adaptação de animais sinantrópicos caracterizados com elevado potencial para reservatório do parasita (ALVAR et al., 2012). Economicamente, a região é baseada no extrativismo vegetal e na agropecuária, sendo esses serviços propícios ao contato com o vetor, assumindo uma das características da LT, doença ocupacional devido às atividades profissionais em áreas endêmicas (MATTOS et al. 2023).

Figura 4 - Índice de leishmaniose cutânea, Brasil, 2020-2022.



Legenda: O Ministério da Saúde informou 1208 casos de municípios não identificados que não foram incluídos nos cálculos do índice composto de leishmaniose.

Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas (SisLeish) [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2023.

O Estado de Pernambuco, localizado na região Nordeste do país, apresenta 34% dos seus municípios endêmicos para LT, decorrente da predominância em agricultura familiar, criação de animais com grande porte e espécies de flebotomíneos adaptadas ao peridomicílio (ARAÚJO et al., 2022). O município de Timbaúba é relatado em estudo de caso-controle, apresentando características rurais e múltiplas espécies de vetores para LT, sendo esses fatores um indicador para incidência na transmissão da doença, potencializado pela presença de vegetação densa próxima às residências, crucial na permanência de flebotomíneos nessa região (DE ARAUJO et al., 2016). Por isso, é fundamental o monitoramento da prevalência da LT e a identificação de casos para estratégias de controle e tratamento eficaz.

2.3 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

No Brasil, o diagnóstico para LT é vinculado à associação de metodologias complexas que visam obter precisão em seu resultado, utilizando de métodos parasitológicos, moleculares e sorológicos (SZARGIKI et al., 2009). Desafios oriundos da diversidade antigênica, baixa sensibilidade em técnicas tradicionais e procedimentos invasivos para coleta de material, agravado pelo perfil clínico-epidemiológico semelhante a outras patologias com acometimento cutâneo, como hanseníase e tuberculose, são fatores pertinentes ao cenário atual emergente na busca por novas estratégias para um diagnóstico ágil e preciso (REIMÃO et al., 2020). Sua ausência contribui significativamente para a manutenção dos reservatórios parasitários, impactando na disseminação da infecção, tratamentos tardios e deficiência no controle da doença (BRASIL, 2017).

2.3.1 Diagnóstico Molecular

Entre as múltiplas abordagens no diagnóstico da LT, identificar o DNA do parasita por meio de testes moleculares têm demonstrado destaque devido à alta sensibilidade e especificidade (SCHÖNIAN et al., 2003). A utilização de ensaios como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por meio das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR), têm permitido detectar o parasita, identificar a espécie e quantificar a carga parasitária, sendo útil no direcionamento ágil ao tratamento e possibilitando o acompanhamento na resposta a terapia (REITHINGER et al., 2007).

Em sua aplicabilidade, fornece benefícios por apresentar possibilidade de métodos não invasivos na coleta de amostra, realizando através de escova citológica, rolamento na úlcera e obtenção do material celular, entretanto, amostras podem ser obtidas por raspagem e biópsia (BOGGILD et al., 2010). A distribuição do parasita na lesão e o local de amostragem são fatores que impactam na sensibilidade do método, com a zona ulcerada, subdividida entre centro, base e borda, podendo refletir na carga parasitária e análise diagnóstica (DE LOS SANTOS et al., 2024). Estudos relatam a correlação entre esses fatores, demonstrando carga parasitária elevada no centro e base da ulceração, quando comparada as bordas da lesão. Resultados significativamente melhores também foram obtidos por amostragem de escova citológica em relação às raspagens e biópsias (SUÁREZ et al., 2015). Apesar dos resultados promissores, a metodologia de PCR enfrenta obstáculos como altos custos e insumos específicos para realização do teste, potencializado pela carência de laboratório em áreas endêmicas que inviabilizam o transporte de amostras para as regiões centrais e especializadas (MOREIRA et al., 2018).

2.3.2 Diagnóstico Parasitológico

A confirmação direta da infecção por *Leishmania* utiliza técnicas parasitológicas que permitem a visualização de amastigotas proveniente de tecido ulcerado. Métodos como microscopia, cultura *in vitro* e histopatologia são alternativas viáveis nesse processo (GOTO et al., 2010). O tipo de espécime associado a metodologia é essencial na obtenção de um resultado preciso. Segundo a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA), a amostra adequada para o exame é proveniente de uma lesão limpa, sem artefatos como exsudatos, com a base da ulceração destinada a cultura *in vitro* e as bordas ulceradas para histopatologia (ARONSON et al., 2017). A coleta do tecido é realizada por biópsia, aspirado ou raspagem, técnicas invasivas e exigentes de um local com suporte adequado para realização (PIYASIRI et al., 2023). Para microscopia, é utilizado a coloração Giemsa, na qual a amostra corada e com presença do parasita apresenta como característica um citoplasma azulado e um núcleo avermelhado, evidenciando a forma intracelular (CHULAY et al., 1983). O processo de cultura *in vitro* apresenta algumas exigências como o tempo de quatro semanas, temperatura a 25 °C, meios de cultura MacNeal e *Drosophila* de Schneider como condições essenciais ao crescimento do parasita e possibilitando a identificação

no estágio promastigota (MANN et al., 2021).

2.3.3 Diagnóstico Sorológico

Na década de 80, foi implementado no Sistema Único de Saúde (SUS) a Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM), que consiste em teste imunológico capaz de induzir uma reação de hipersensibilidade retardada, por estímulo a resposta celular do hospedeiro (GONTIJO et al., 2003). A aplicabilidade do método compreende na inoculação de antígeno bruto de *Leishmania* por via intradérmica, no antebraço do paciente. A positividade é caracterizada pelo endurecimento local e formação de pápula, entre 48 e 72h, igual ou superior a 5 milímetros, provocada pela concentração de linfócitos e macrófagos (GOMES et al., 2014). De acordo com dados fornecidos pelo Ministério da Saúde, pacientes com LMC frequentemente apresentam reatividade exacerbada para IDRM, com ocorrência de ulceração e necrose local. Já os pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD), predominantemente, exibem ausência de reatividade (BRASIL, 2017). Entre as limitações encontradas nesta metodologia, evidencia-se: resultado positivo proveniente de uma exposição anterior ao antígeno utilizado no IDRM; processo alérgico decorrente à utilização de diluente no teste; reações cruzadas com outros patógenos similares na composição de antígenos; além da incapacidade em diferenciar o estado infeccioso, entre agudo ou crônico (PARANHOS-SILVA et al., 2001). Devido a combinação desses fatores que inviabilizam um diagnóstico preciso, o Ministério da Saúde extinguiu nacionalmente a produção do antígeno referente ao IDRM e comercialização do teste (PINHEIRO et al., 2020).

Metodologias como imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT) e testes imunocromatográficos (ICT) são alternativas sorológicas viáveis ao cenário inconsistente para diagnóstico da LT (PAGNIEZ et al., 2023). O IFI consiste na utilização de antígenos, comum na forma evolutiva promastigota, fixados em lâmina de vidro para detectar anticorpos presentes no soro do indivíduo, mediados por anticorpos secundários associados com corante fluorescente. A emissão de luminosidade observada em microscópio de fluorescência indica infecção, porém apresenta limitações devido à baixa correlação entre anticorpos circulantes e intensidade da doença (CAVALCANTI et al., 2015).

Indivíduos portadores de LT comumente apresentam baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, evidenciando um obstáculo relevante ao imunodiagnóstico da patologia. Contudo, a aplicabilidade do ELISA nas Américas tem exibido resultados promissores através da utilização de antígenos solúveis, porém a sensibilidade permanece variável (GOTO et al., 2010). Estudos relatam maior sensibilidade na identificação de anticorpos contra *L.V. braziliensis* mediados por ELISA (98,2%) quando comparado ao IFI (79,6%) em indivíduos com LT no Brasil (ROMERO et al., 2005). Os ensaios produzidos com antígeno solúvel ou extrato bruto de *Leishmania* também contém variações na especificidade por apresentar reatividade cruzada com outros patógenos pertencentes à família *Trypanosomatidae*, fato relatado em estudo em áreas endêmicas para a Doença de Chagas (FRANK et al., 2003). A quantidade de métodos sorológicos utilizados evidencia a insuficiência na precisão diagnóstica e a emergência estratégica para otimização de ferramentas ao sorodiagnóstico. Uma alternativa promissora são os estudos *in silico* destinados ao mapeamento de epítomos para a síntese de proteínas recombinantes (GRAZLEWSKA et al., 2023).

2.4 PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SORODIAGNÓSTICO

Entre as contribuições no diagnóstico desafiador da LT, a abordagem e investigação de proteínas recombinantes, por meio das técnicas de engenharia genética, têm alcançado destaque entre as metodologias, devido aos resultados promissores (SOUZA et al., 2013). A expressão de proteínas alvo em sistemas heterólogos, cujos organismos não contém naturalmente o gene em análise, têm se destacado por permitir a produção do antígeno de interesse em larga escala e obtenção de peptídeos específicos, através da tecnologia do DNA recombinante, reduzindo a variabilidade encontrada em antígenos naturais (BRITTO et al., 2021).

O uso de extrato bruto de *Leishmania* e antígenos solúveis em sorodiagnóstico, contém variedade de proteínas do parasita, ampliando as interações com anticorpos, consequentemente aumentando a possibilidade das reações cruzadas com espécies que apresentam similaridade proteica (MENEZES et al., 2015). No entanto, segmentos de proteínas, os epítomos, apresentam capacidade em estimular uma resposta imunológica específica, sendo viável a identificação dessas pequenas

regiões para análise de conservação entre espécies e como potencial alvo imunológico (GALVANI et al., 2022). Estudo realizado nacionalmente em Minas Gerais, relata o uso de proteína recombinante de *L. braziliensis* e peptídeo sintético com epítipo para células B, apresentando bom desempenho, elevando a especificidade, quando comparado as metodologias que utilizam extrato bruto, corroborando para maior acurácia ao aumentar precisão, favorecer a padronização, reduzir falsos-positivos e falsos-negativos (MENEZES et al., 2015).

2.5 ORTOLOGIA E PARALOGIA

A inferência de regiões conservadas auxilia na identificação de similaridade e diferenças entre organismos, otimizando na perspectiva da LT, e na busca por alvos potenciais para testes de diagnóstico (CUADRAT et al., 2014). Genes conservados, que devido ao processo evolutivo de especiação, estão presentes em espécies distintas e são originados por um ancestral em comum, conferem ortologia entre organismos, diferindo dos genes parálogos que surgem por processo de duplicação gênica (ALTENHOFF et al., 2012). Dessa forma, a predição de ortologia é essencial para o fornecimento de informações funcionais entre sequências proteicas e na identificação de elementos regulatórios conservados, já que os ortólogos geralmente desempenham funções biologicamente equivalentes, enquanto parálogos frequentemente divergem na sua funcionalidade após duplicação (GABALDON et al., 2013). Um estudo realizado na Suécia, relatou a conservação e similaridade de domínios estruturais em sequência entre proteínas ortólogas quando comparadas às proteínas parálogas, corroborando para concepção de análise e compreensão da ortologia, na busca por proteínas fundamentais à resposta imunológica e identificação de antígenos específicos, potencializando o avanço no diagnóstico sorológico (FORSLUND et al., 2011).

2.6 FUNDAMENTOS PARA O PRESENTE TRABALHO

O primeiro estudo que serviu de base para o presente trabalho consistiu na caracterização de cinco antígenos recombinantes derivados de proteínas de *L.*

infantum e identificados a partir de um rastreamento sorológico de uma biblioteca de cDNA. Estes antígenos apresentaram então potencial como candidatos para o sorodiagnóstico da LV, dos quais, apenas três (Lci2; Lci3 e Lci5) apresentaram baixa reatividade cruzada com a LT, reagindo entre 2,5%, 3,5 % e 9,6%, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2011). Posteriormente, expandindo o painel das proteínas recombinantes, agora por meio de rastreamento equivalente em uma biblioteca de expressão genômica, sete antígenos foram identificados e caracterizados, dos quais, apenas cinco (Lci6; Lci7; Lci9, Lci11e Lci13) exibiram reação cruzada com LT, variando entre 13%,17%, 56%, 25% e 12,5%, respectivamente (MAGALHÃES et al., 2017). Novas ferramentas de bioinformática têm tornado a predição de epítomos uma alternativa de otimização aos testes sorológicos, e a aplicação destas ferramentas recentemente proporcionou a construção de novas proteínas recombinantes multiepítomos, que apresentaram elevado potencial no diagnóstico sorológico da LV (SILVA et al., 2025 em andamento). Com base nestes resultados, foi idealizado então o presente trabalho baseado na busca por ortólogos de *L. braziliensis* daquelas proteínas avaliadas como relevantes para o diagnóstico sorológico da LV e visando identificar domínios conservados e antigênicos para possível aplicação sorológica na LT.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar ortólogos de *Leishmania braziliensis* de proteínas sabidamente antigênicas de *Leishmania infantum* e avaliar *in silico* o seu potencial no diagnóstico sorológico específico da leishmaniose tegumentar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar, em *L. braziliensis*, sequências codificantes de ortólogos de proteínas *L. infantum* previamente identificadas como relevantes para o diagnóstico sorológico;
- II. Verificar *in silico* as regiões de homologia entre as sequências de referência da *L. infantum* selecionadas e seus ortólogos de *L. braziliensis*;
- III. Definir regiões conservadas e divergentes, repetitivas ou não, de cada um dos ortólogos de *L. braziliensis* selecionados;
- IV. Realizar predição de epítomos com base nas sequências proteicas dos ortólogos de *L. braziliensis*, identificando aqueles potencialmente mais relevantes para um diagnóstico sorológico futuro.

4 METODOLOGIA

4.1 PAINEL DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Proteínas recombinantes provenientes de *Leishmania infantum* passíveis de uso no diagnóstico sorológico da LV, foram identificadas por meio de biblioteca de cDNA (Lci2, Lci3 e Lci5) e biblioteca de expressão genômica (Lci6, Lci7, Lci9, Lci11 e Lci13). O critério de seleção desses antígenos, notificados em estudos que precedem o atual trabalho, foi a porcentagem significativa de reatividade cruzada com LT, variando entre 2,7% e 56%, viabilizando a pesquisa por ortólogos para *Leishmania braziliensis* e com possível aplicabilidade em sorodiagnóstico para LT.

4.2 OBTENÇÃO DE ORTÓLOGOS PARA *L. BRAZILIENSIS*

A pesquisa por ortologia foi realizada *in silico* através dos depósitos no banco de dados público TrypDB, especializado em parasitas da família *Trypanosomatidae* (ASLETT et al., 2010). A obtenção dos ortólogos deu-se por meio do algoritmo The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), que consiste em fornecer uma sequência conhecida de nucleotídeos (BLASTn) ou de aminoácidos (BLASTp), identificando sequências que se assemelham a sequência fornecida, exibindo um valor e-value (E) que demonstra a probabilidade de acerto na sequência encontrada ser similar a sequência fornecida, sendo os valores baixos e próximos a zero os de maior compatibilidade. Dessa forma, foi selecionado o tipo de sequência para proteínas, indicando o programa BLAST a ser executado do tipo BLASTp, com seleção de organismo alvo para a cepa de referência *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, inserindo a sequência de entrada, sendo apenas a sequência conservada não repetitivas dos diferentes antígenos recombinantes, em formato fasta (ALTSCHUL et al., 1990).

4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQUÊNCIAS

A busca por homologia entre as proteínas recombinantes provenientes de *L. infantum* e dos ortólogos de *L. braziliensis*, foi efetuada por meio do *software* Ugene Pro (versão 50.0), avaliando a sequência codificadora das proteínas e dos múltiplos

motivos repetitivos encontrados em *tandem* e através do alinhamento par a par entre as sequências, para inferir o grau de conservação entre espécies. As sequências foram importadas em arquivo fasta, utilizando a interface Clustal Omega para execução do alinhamento, seguindo os parâmetros padronizados, sendo seus resultados exibidos em visualização gráfica colorida, destacando as conservações em cores idênticas, substituições em cores distintas e espaços representados por lacunas indicando inserções ou deleções (THOMPSON et al., 2002).

4.4 PREDIÇÃO LINEAR DE EPÍTOPOS

4.4.1 Predição linear de epítomos para células B

Para prever epítomos lineares de células B nas proteínas ortólogas a *L. braziliensis* e proteínas recombinantes de *L. infantum*, foi utilizado o programa ABCpred, com sequência de aminoácidos em formato fasta, limiar de 0.51 e janela de comprimento com 16 aminoácidos. Foram considerados como epítomos candidatos aqueles que apresentaram sequências distintas e com pontuações de predição variante entre 0.91 e 0.81. Para confirmar a especificidade do epítomo, o software BepiPred 2.0 foi consultado submetendo a sequência de aminoácidos em formato fasta e limiar 0.5, através da exibição por gradiente laranja, foi confirmada a previsão do epítomo. Gradientes escuros indicaram fortes candidatos a antigenicidade e gradientes claros indicaram fracos candidatos antigênicos.

4.4.2 Predição linear de epítomos para complexo de histocompatibilidade de classe II

A predição de epítomos ligantes a molécula MHC de classe II foi realizada através do software NetMHCII 2.3, com sequência de aminoácidos submetidas em formato fasta, comprimento do peptídeo 15, locus HLA-DR, alelo HLA-DRB1_0101, com limiar para ligante forte (2) e ligante fraco (10). Foram considerados como epítomos candidatos, os dez primeiros que apresentaram rank igual a 100% e na ausência de compatibilidade completa, o percentual considerado foi decrescente.

5 RESULTADOS

5.1 Painel de proteínas recombinantes e seus ortólogos

A partir dos antígenos de *L. infantum*, foram identificadas por meio da ferramenta BLASTp sete proteínas ortólogas da cepa de referência *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904. Estas pertencem a famílias de proteínas distintas do gênero *Leishmania* e apresentam variações em produtos proteicos e no comprimento da sequência. Na tabela 1 é possível observar o painel de proteínas recombinantes de *L. infantum* avaliadas e seus ortólogos em *L. braziliensis*.

Tabela 1 – Painel de proteínas recombinantes com seu respectivo ortólogo

Antígeno <i>L. infantum</i>	Reatividade cruzada com LT (%)	Ortólogo <i>L. braziliensis</i>	ID TritypDB	Comprimento da sequência (aa)
Lci2	2,7%	Cinesina K39 (Lci2b)	LbrM.14.1100:mRNA	2155
Lci3	3,5%	Proteína da zona de fixação flagelar (Lci3b)	LbrM.20.0620	3658
Lci5	9,6%	Proteína flagelar (Lci5b)	LbrM.33.3350:mRNA	4434
Lci6	13%	Proteína associada a microtúbulos (Lci6b)	LbrM.26.1870:mRNA	2524
Lci7	17%	Proteína sti1 induzida por estresse (Lci7b)	LbrM.08.0880:mRNA	547
Lci9	56%	-	-	-
Lci11	25%	Proteína de interação com o eIF4E (Lci11b)	LbrM.34.3960:mRNA	772
Lci13	12,5%	Proteína de choque térmico (Lci13b)	LbrM.30.2440:mRNA	658

Legenda: Lci - proteínas recombinantes. LT- leishmaniose tegumentar. aa- aminoácidos

Fonte: O autor.

5.2 Identificação dos ortólogos e análise de motivos repetitivos

Para o antígeno Lci2, através da ferramenta BLASTp e com valor E de 0.0, foi obtido um ortólogo proveniente de uma cinesina K39 (Lci2b), composta por uma sequência com 2.155 resíduos, sendo verificada em sua extremidade N-terminal uma região conservada e com motivos não repetitivos. Já a análise entre a região central e extremidade C-terminal, não apresentaram conservação e foram identificados três motivos repetitivos, sendo: um primeiro motivo composto por 49 aminoácidos representado por 14 repetições; o segundo motivo, também composto por 49 aminoácidos, que difere do primeiro por apresentar a substituição de um aminoácido no resíduo 31 do motivo, sendo substituído um ácido glutâmico por uma lisina, com duas repetições; e o terceiro motivo composto por 42 aminoácidos, em 8 repetições. Na tabela 2 é possível observar o ortólogo da proteína recombinante Lci2 e seus respectivos motivos repetitivos em *L. braziliensis*.

Tabela 2 – Motivos repetitivos em *L. braziliensis* com ortologia para o antígeno Lci2

Ortólogo	Motivo repetitivo	Posição inicial do motivo na sequência	Posição final do motivo na sequência
Cinesina K39	LAEWKARATSVDAERGDLSERLARLEGEHAELGKAHAKLDKTNAALEQQ	771-819	1.940-1.988
Cinesina K39	LAEWKARATSVDAERGDLSERLARLEGEHAKLGKAHAKLDKTNAALEQQ	918-966	1.016-1.064
Cinesina K39	LAEWKARATSVDAERGDLSERLARLEGEHAELGKTNAALEQQ	1.065-1.106	1.800-1.841

Fonte: O autor

Para o antígeno Lci3, por BLASTp e valor E de 0.0, foi obtido um ortólogo proveniente da proteína da zona de fixação flagelar (Lci3b), representado por uma sequência de 3.658 resíduos. Esta proteína apresenta uma região N-terminal conservada e com ausência de motivos repetitivos. Entretanto, a partir da região central até a extremidade C-terminal, a sequência é divergente quando comparada a mesma região em *L. infantum*, apresentando quatro motivos repetitivos, sendo três deles similares e um distinto, todos compostos por 14 aminoácidos, variando em número de repetições e algumas substituições de resíduos, sendo encontrados, respectivamente, em 9, 29, 13 e 37 repetições ao longo da sequência. Na tabela 3 estão descritos os motivos repetitivos do ortólogo que foram identificados para Lci3 em *L. braziliensis*.

Tabela 3 – Motivos repetitivos em *L. braziliensis* com ortologia para o antígeno Lci3

Ortólogo	Motivo repetitivo	Número de repetições	Posição inicial do motivo na sequência	Posição final do motivo na sequência
Proteína da zona de fixação flagelar	ERLASELEKAQEEA	9	891 - 905	3.438 – 3.452
Proteína da zona de fixação flagelar	ERLAGELEKAQADA	29	905 - 918	3.354 – 3.367
Proteína da zona de fixação flagelar	ERLAEELSLQEEA	13	1.199 – 1.212	3.4661-3.479
Proteína da zona de fixação flagelar	EAQRAENGKLCGDN	37	863-876	3.452-3.465

Fonte: O autor.

Para o antígeno Lci5, por BLASTp e apresentando valor E de 0.0, foi obtido um ortólogo codificante de proteína flagelar (Lci5b), composto por uma sequência de 4.434 resíduos, apresentando da sua extremidade N-terminal até a extremidade C-terminal motivos repetitivos e uma curta região não repetitiva no N-terminal. Foram identificados quatro motivos repetitivos similares compostos por 120 aminoácidos, respectivamente, consistindo em: 4,2,1,1 repetições, representados na figura 5A. Além disso, foi encontrado um motivo repetitivo composto por 38 aminoácidos, seguidos de 7 repetições, representados na figura 5B.

Figura 5 – Motivos repetitivos em *L. braziliensis* com ortologia para o antígeno Lci5

A Lci5b 120 AA motivos repetitivos

MVAHEARAPALQRVGTPEEPRVGLVATTHRVRLDGDAWARVLEACPDLLKQEFSTSDVCDATSLPPTSMRRLVLAAGSLVADFE~~LAHGG~~LARTELNEQIARSPFFTRTWALYQRVAAPEETL (4)
MVAHEARAPALQRVGTPEEPRVGLVATKHRVRLDGDAWARVLEACPDLLKQEFSTSDVCDATSLPPTSMRRLVLAAGSLVADFE~~LAHGG~~LARTELNEQIARSPFFTRTWALYQRVAAPEETL (2)
MVAHEARAPALQRVGTPEEPRVGLVATKHRVRLDGDAWARVLEACPDLLKQEFSTSDVCDATSLPPTSMRRLVLAAGSLVADFE~~LAHGG~~LARTELNEQIARSPFFTRTWALYQRVAAPEETL (1)
MVAHEARAPALQRVGTPEEPRVGLVATKHRVRLDGDAWARVLEACPDLLKQEFSTSDVCDATSLPPTSMRRLVLAAGSLVADFE~~LAHGG~~LARTELNEQIARSPFFTRTWALYQRVAAPEETL (1)

B Lci5b 38 AA motivos repetitivos

GPRAAPPALQDSESFASLDVEEPPAVLAREGTPEVAT (7)

C Lci5 e Lci5b motivos repetitivos homólogos

APALQRVGTF
TTHRVRLDGD
PDLLKQEFSTSDVCDAT
SPFFTRTWALY
AGSLVADF
SESFASLD

Legenda: o número de cópias de cada repetição encontrado na sequência é indicado entre parênteses. A similaridade entre sequências é indicada por resíduos sublinhados. **A**, motivos repetitivos com 120 resíduos do antígeno Lci5b. **B**, motivos repetitivos com 38 resíduos do antígeno Lci5b. **C**, motivos repetitivos fragmentados, apresentando homologia entre os antígenos Lci5 e Lci5b.

Fonte: O autor.

Ao avaliar as sequências do antígeno recombinante Lci5 com Lci5b, foi identificado homologia apenas com alguns fragmentos contidos nos grandes motivos repetitivos (Figura 5C), indicando a conservação por meio de 6 fragmentos consistindo em: primeiro fragmento com 17 repetições de 10 aminoácidos; segundo fragmento com 24 repetições de 10 aminoácidos; terceiro fragmento com 21 repetições de 16 aminoácidos; quarto fragmento com 24 repetições de 10 aminoácidos; quinto fragmento com 24 repetições de 8 aminoácidos; e o sexto fragmento com 16

repetições de 8 aminoácidos (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência dos motivos repetitivos homólogos entre Lci5 e Lci5b

Motivo repetitivo	Repetições em <i>L. infantum</i>	Repetições em <i>L. braziliensis</i>
APALQRVGTP	5	17
TTHRVRDGD	5	24
PDLLKQEFTSDVCDAT	5	21
SPFTRTWALY	5	24
AGSLVADF	5	24
SESFASLD	4	16

Fonte: O autor.

Para o antígeno Lci6, através do BLASTp e valor E de 0.0, foi obtido um ortólogo proveniente de uma proteína associada a microtúbulos (Lci6b), composta por uma sequência de 2.524 resíduos, apresentando uma região N-terminal não repetitiva e conservada. A conservação também é identificada na sua porção central até a extremidade C- terminal, entretanto, em sua região C-terminal foi identificado um grande motivo repetitivo, sendo composto por 93 aminoácidos, seguido por duas repetições. (Figura 6A).

Figura 6 – Motivos repetitivos em *L. braziliensis* com ortologia para o antígeno Lci6

A Lci6b 93 AA motivos repetitivos

REMTTTLQDCGFEGTDWDYVWSIKQEAMCEAFAQGVADALGIRPADVQNINMEKSDDGIVLGASVTHPLVQDYQTIQKALKDHPFEELWVLYE (2)

B Lci6 e Lci6b motivos repetitivos homólogos

DCGFEG

DWDYVWSIKQEAM

GVADALGI

QNINMEKS

HPFEELW

Legenda: o número de cópias da repetição encontrado na sequência é indicado entre parênteses. **A**, motivos repetitivos com 93 resíduos, encontrados na região C-terminal do antígeno Lci6b. **B**, motivos repetitivos fragmentados, apresentando homologia entre os antígenos Lci6 e Lci6b, encontrados na região C-terminal.

Fonte: O autor.

Ao avaliar as sequências do antígeno recombinante Lci6 com Lci6b, foi identificado homologia em grande parte da sequência, incluindo regiões não repetitivas e repetitivas, diferindo poucos aminoácidos e apresentando boa conservação. Sendo assim, alguns fragmentos contidos no grande motivo repetitivos de 93 aminoácidos, são homólogos entre as proteínas recombinantes (Figura 6B), indicando a conservação por meio de 5 fragmentos consistindo em: primeiro fragmento com 2 repetições de 6 aminoácidos; segundo fragmento com 2 repetições de 13 aminoácidos; terceiro fragmento com 2 repetições de 8 aminoácidos; quarto fragmento com 2 repetições de 8 aminoácidos; e quinto fragmento com 2 repetições de 7 aminoácidos. (Tabela 5).

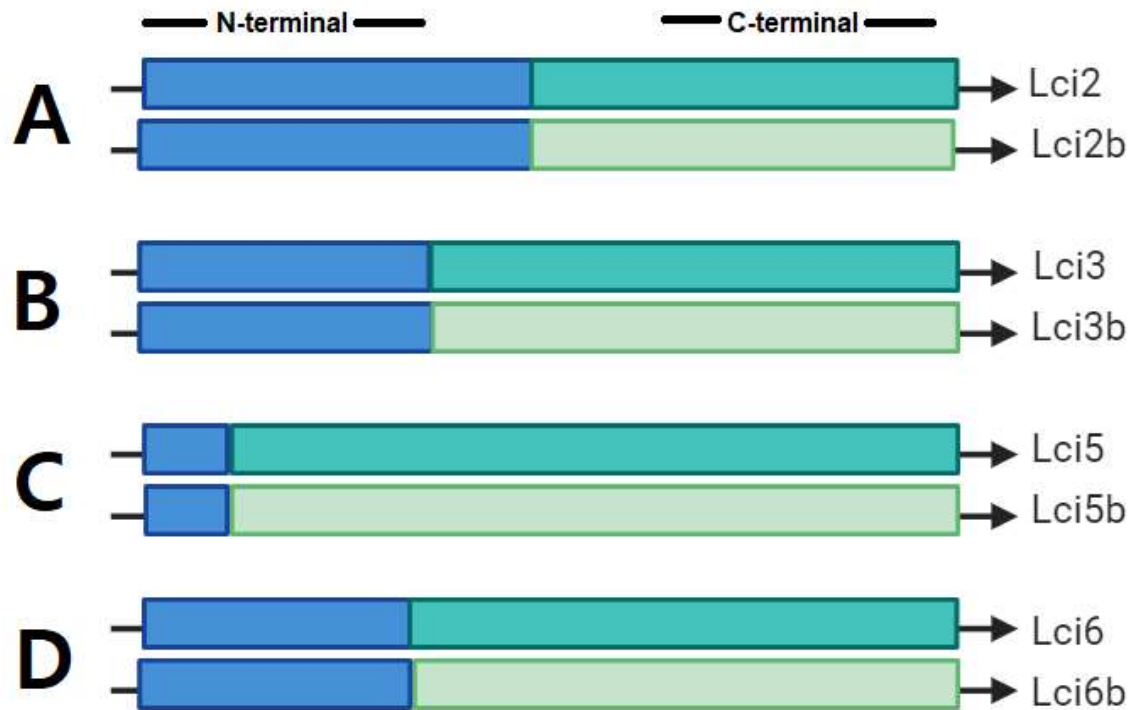
Tabela 5 – Frequência dos motivos repetitivos homólogos entre Lci6 e Lci6b

Motivo repetitivo	Repetições em <i>L. infantum</i>	Repetições em <i>L. braziliensis</i>
DCGFEG	2	2
DWDYVWSIKQEAM	2	2
GVADALGI	2	2
QNINMEKS	2	2
HPFEELW	2	2

Fonte: O autor.

Portanto, foram obtidos quatro ortólogos (Lci2b; Lci3b; Lci5b e Lci6b) apresentando motivos repetitivos em sua composição, assim como seus respectivos antígenos recombinantes (Lci2; Lci3; Lci5 e Lci6). Na figura 7 é possível observar uma representação esquemática das quatro proteínas recombinantes de *L. infantum* previamente descritas, incluindo as regiões não repetitivas e repetitivas descritas previamente (Oliveira et al., 2011; Magalhães et al., 2017), com seus respectivos ortólogos em *L. braziliensis*, estimando na sequência de composição do antígeno, as regiões conservadas e regiões repetitivas, como citadas anteriormente, conforme identificadas em extremidades N-terminal, região central e C-terminal.

Figura 7 – Representação esquemática das regiões não repetitivas e regiões com motivos repetitivos em *L. infantum* e *L. braziliensis*



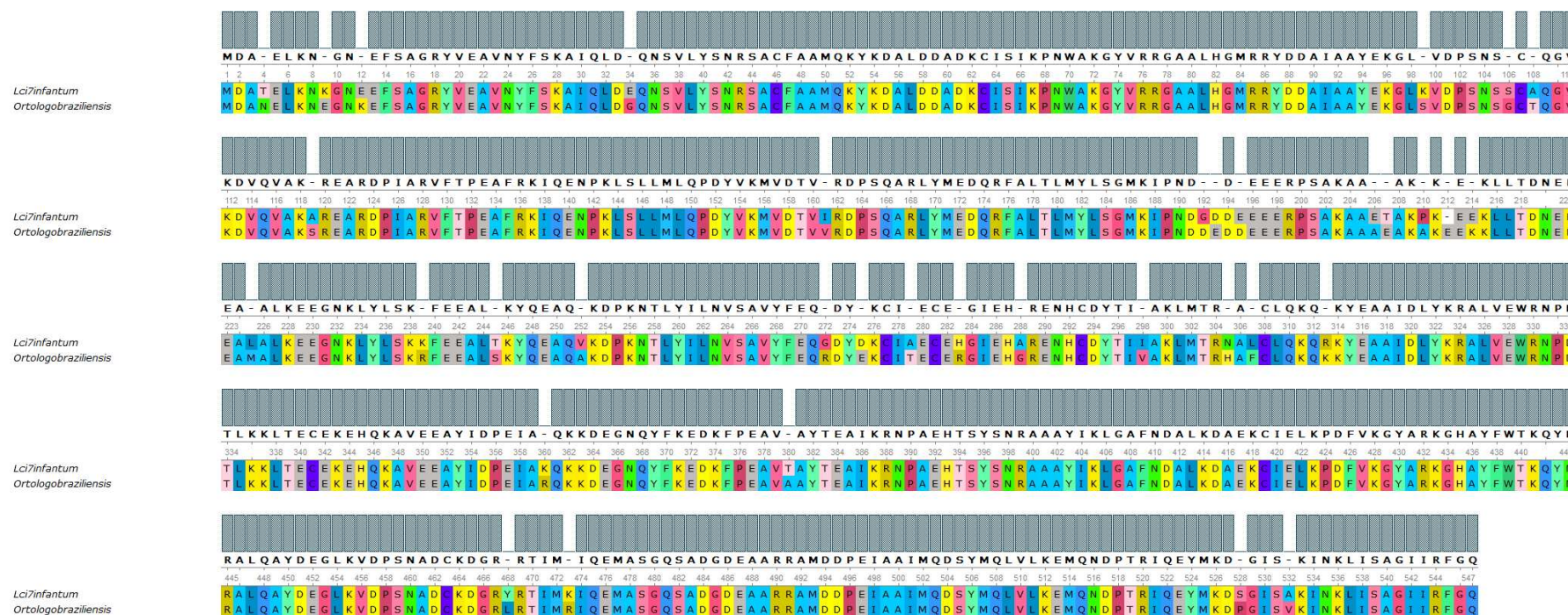
Legenda: Caixa azul – região não repetitiva. Caixa verde – região com motivos repetitivos. **A**, proteínas recombinantes Lci2 e Lci2b com suas regiões estimadas. **B**, proteínas recombinantes Lci3 e Lci3b com representação das regiões identificadas. **C**, proteínas recombinantes Lci5 e Lci5b com suas regiões estimadas. **D**, proteínas recombinantes Lci6 e Lci6b com representação das regiões identificadas.

Fonte: O autor.

5.3 Análise de conservação entre sequências por alinhamento par a par

Para o antígeno Lci7, foi obtido um ortólogo de proteína sti1 induzida por estresse, composto por sequência de 547 resíduos, na qual não foram identificados motivos repetitivos, apresentando homologia entre *L. infantum* e *L. braziliensis* (Figura 8).

Figura 8 – Alinhamento par a par entre sequências do antígeno Lci7 *L. infantum* e ortólogo *L. braziliensis*.

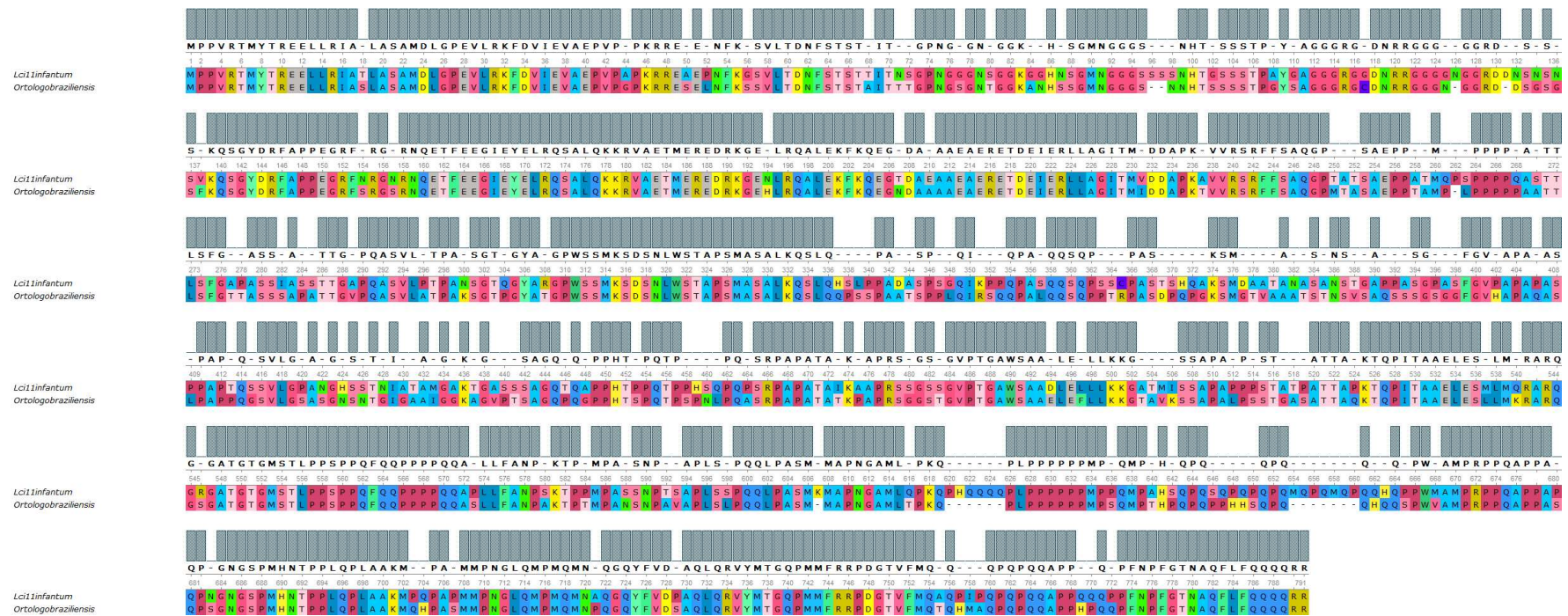


Legenda: Barras em cinza indicam conservação entre aminoácidos. Lacunas indicam mudança entre aminoácidos. Eixo vertical representa o nível de conservação entre sequências analisadas. Eixo horizontal representa a sequência analisada e a posição dos aminoácidos. Cores iguais indicam aminoácidos equivalentes e cores distintas indicam mudança de aminoácido.

Fonte: O autor.

Para o antígeno Lci9, não foi encontrado ortologia com *L. braziliensis*. No entanto, com o antígeno Lci11, foi obtido um ortólogo referente a proteína de interação com o eIF4E, composta por uma sequência com 772 resíduos. Sendo assim, não foram encontrados motivos repetitivos, apresentando homologia entre *L. infantum* e *L. braziliensis* (Figura 9).

Figura 9 – Alinhamento par a par entre sequências do antígeno Lci11 *L. infantum* e ortólogo *L. braziliensis*.

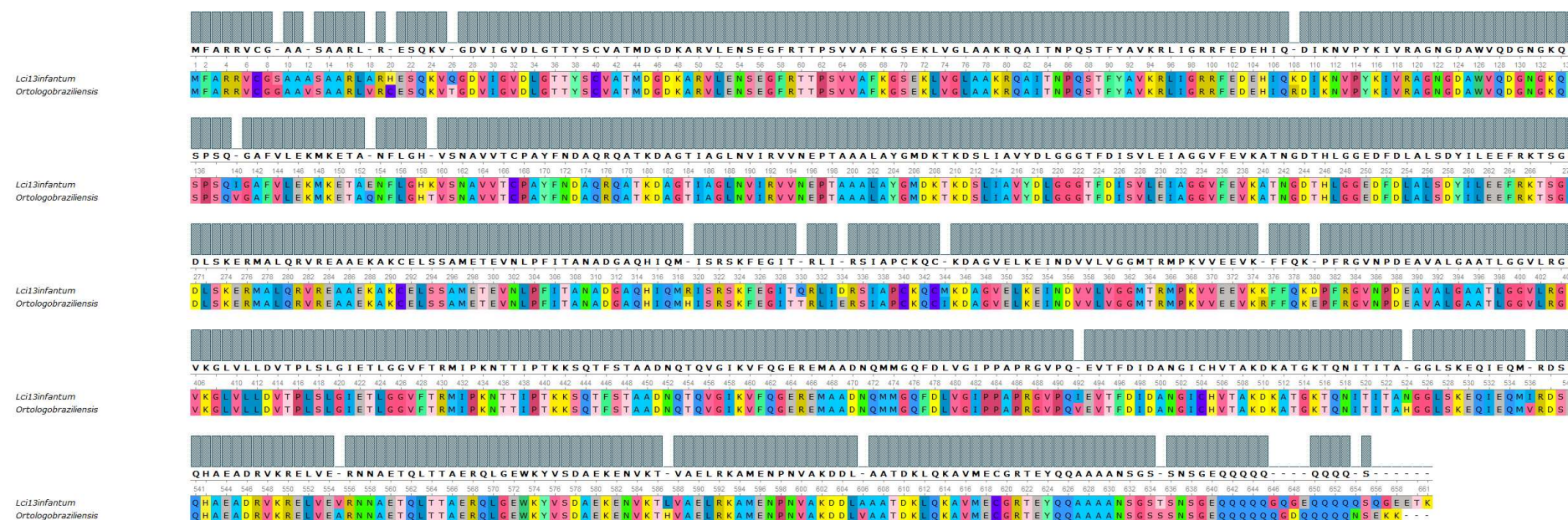


Legenda: Barras em cinza indicam conservação entre aminoácidos. Lacunas indiciam mudança entre aminoácidos. Eixo vertical representa o nível de conservação entre sequências analisadas. Eixo horizontal representa a sequência analisada e a posição dos aminoácidos. Cores iguais indicam aminoácidos equivalentes e cores distintas indicam mudança de aminoácido.

Fonte: O autor.

Para o antígeno Lci13, foi obtido um ortólogo proveniente a proteína de choque térmico, composto por uma sequência com 658 resíduos, apresentando homologia entre *L. infantum* e *L. braziliensis*. Não foram encontrados motivos repetitivos (Figura 10).

Figura 10 – Alinhamento par a par entre sequências do antígeno Lci13 *L. infantum* e ortólogo *L. braziliensis*.



Legenda: Barras em cinza indicam conservação entre aminoácidos. Lacunas indicam mudança entre aminoácidos. Eixo vertical representa o nível de conservação entre sequências analisadas. Eixo horizontal representa a sequência analisada e a posição dos aminoácidos. Cores iguais indicam aminoácidos equivalentes e cores distintas indicam mudança de aminoácido.

Fonte: O autor.

5.4 Predição de epítomos

A partir da proteína Lci2b, foram identificados 10 epítomos pelo programa ABCpred e 10 epítomos através da ferramenta NetMHCII 2.3, indicando a região mais imunogênica com potencial para reconhecimento de anticorpos específicos. Os epítomos detectados pelos dois programas são compatíveis, no entanto apresentam pequenas variações referente a capacidade preditiva (Tabela 6).

Tabela 6 - Predição de epítomos de células B por ABCpred e epítomos para MHC de classe II por NetMHCII 2.3, para proteína Lci2b ortólogo a Lci2.

Epítomo ABCpred	Score	Epítomo NetMHCII 2.3	+ Antigênico NetMHCII 2.3	Score
AALEQQLAEWKARATS	0.86	EQQLAEWKARATSVD	EWKARATSV	80%
TVASKAAPLSAAKYPT	0.85	AAPLSAAKYPTTARL	LSAAKYPTT	80%
HREAHASYSVLAGDGE	0.84	EAHASYSVLAGDGEL	YSVLAGDGE	70%
EGEHAELGKSHAKLTR	0.84	LEGEHAELGKSHAKL	LEGEHAELG	90%
AELGKAHAKLDKTNAA	0.83	AELGKAHAKLDKTNA	LGKAHAKLD	90%
RLEGEHAELGKAHAKL	0.82	RLEGEHAELGKAHAK	LEGEHAELG	80%
HTDVVEEVQSVRRVKE	0.79	TRLHTDVVEEVQSVR	DVEEEVQSV	90%
DAQRGDLYEHLARLDG	0.78	VDAQRGDLYEHLARL	QRGDLYEHL	80%
LRERAACAEDVQQLS	0.78	LRERAACAEDVQQL	ERAACAEDY	90%
ERTVEGLRERAACAEY	0.77	EELERTVEGLRERAA	VEGLRERAA	90%

Legenda: score ABC pred – probabilidade do peptídeo ser imunogênico, com variações entre 0 e 1, com valores próximos de 1 indicando alta capacidade do peptídeo ser reconhecido por células B.

+Antigênico NetMHCII 2.3 – região central do peptídeo, essencial para interação estável com a molécula MHC. score NetMHCII 2.3 – capacidade preditiva do peptídeo ligar ao MHC de classe II.

Fonte: O autor.

Por fim, com a proteína Lci3b, foram obtidos 10 epítomos pelo programa ABCpred e 10 epítomos por meio da ferramenta NetMHCII 2.3, indicando a região mais imunogênica com potencial para reconhecimento de anticorpos específicos. Os epítomos detectados pelos dois programas são compatíveis, no entanto apresentam pequenas variações referente a capacidade preditiva (Tabela 7).

Tabela 7 – Predição de epítomos de células B por ABCpred e epítomos para MHC de classe II por NetMHCII 2.3, para proteína Lci3b ortólogo a Lci3.

Epítopo ABCpred	Score	Epítopo NetMHCII 2.3	+ Antigênico NetMHCII 2.3	Score
NELWEDPSGDMKQVV	0.91	NELWEDPSGDMKQVV	LWEDPSGDM	95%
RAEIGKLCGDNERLVE	0.85	QRAEIGKLCGDNERL	IGKLCGDNE	85%
HTKIFDGNWEKIVRDR	0.85	TRHTKIFDGNWEKIV	FDGNWEKIV	85%
RGDELEKLHDDAERLA	0.83	RGDELEKLHDDAERL	KLHDDAERL	100%
TGELDKLCRRTPRGDE	0.83	TGELDKLCRRTPRGD	LDKLCRRTP	100%
AGELEKAQEDAERLTG	0.83	AGELEKAQEDAERLT	KAQEDAERL	85%
QEEAEAQRAENGKLCG	0.83	QEEAEAQRAENGKLC	AEAQRAENG	100%
EKVQADAETLTAELDK	0.83	KVQADAETLTAELDK	KVQADAETL	80%
AFVIDSGNACHVPGDR	0.82	IDSGNACHVPGDRIT	IDSGNACHV	80%
RVEAYEVLCCEREKDCG	0.81	RVEAYEVLCCEREKDG	YEVLCCEREK	90%

Legenda: score ABC pred – probabilidade do peptídeo ser imunogênico, com variações entre 0 e 1, com valores próximos de 1 indicando alta capacidade do peptídeo ser reconhecido por células B.

+Antigênico NetMHCII 2.3 – região central do peptídeo, essencial para interação estável com a molécula MHC. score NetMHCII 2.3 – capacidade preditiva do peptídeo ligar ao MHC de classe II.

Fonte: O autor.

Em geral, os peptídeos obtidos pelos programas ABCpred e NetMHCII pertencem a extremidade C-terminal das proteínas Lci2b e Lci3b, proveniente de regiões não repetitivas. A Lci2b consta com seis peptídeos localizados na extremidade C-terminal não repetitiva, enquanto a Lci3b consta com oito peptídeos situados na extremidade C-terminal não repetitiva.

6 DISCUSSÃO

No cenário atual para o diagnóstico da LT no Brasil, o teste padrão-ouro consiste na detecção direta do agente etiológico, mas ainda carece de sensibilidade em seus resultados, sendo necessário recorrer a um complexo de metodologias para obter precisão. Diretrizes não recomendavam o imunodiagnóstico para LT devido à baixa produção de anticorpos provocados pela doença, consequentemente resultando em menor sensibilidade nesse formato de diagnóstico (DE VRIES et al., 2022). Entretanto, abordagens utilizando antígenos recombinantes com motivos repetitivos, para aplicação sorológica demonstraram melhores resultados, ao estimular uma resposta imunológica mais específica e aumentar a sensibilidade. A exploração dessa metodologia pode se tornar então viável, contribuindo para o desenvolvimento de testes imunocromatográficos rápidos, visto que possuem vantagens como estabilidade térmica após armazenamento e transporte, influenciando na precisão dos resultados e ampliando o alcance para áreas endêmicas e descentralizadas (CUNNINGHAM et al., 2012).

Proteínas com motivos de repetição em *tandem* (TRM), consistindo em no mínimo duas cópias em padrão de aminoácidos, já foram relatadas como alvo antigênico para células B, produtoras de anticorpos, por esses motivos apresentarem uma resposta imunológica frequente e direcionada, identificados em indivíduos com infecções parasitárias distintas (DAME et al., 1984). Essa perspectiva corrobora com os dados encontrados neste estudo, nos quais foram identificados desde o padrão mínimo para ser considerado um TRM, exatas duas cópias padronizadas com 93 aminoácidos no antígeno recombinante Lci6b, até padrões apresentando múltiplas cópias, como o TRM composto por 14 aminoácidos e encontrado 37 cópias ao longo de toda sequência da proteína Lci3b.

Em estudo prévio analisando 43 genes de *L. infantum*, dos quais 19 codificaram para TRM, esses motivos ao serem avaliados por ELISA, apresentaram bom

desempenho por obter reconhecimento dos anticorpos em soro de pacientes com LV (GOTO et al., 2006). Seguindo essa perspectiva, antígenos recombinantes de *L. infantum* contendo motivos repetitivos também foram avaliados em ELISA, resultando em alta sensibilidade, dessa vez, detectando anticorpos em soro canino portador de LV (MAGALHÃES et al., 2017). Sendo assim, proteínas com motivos repetitivos estimulam uma boa resposta imunológica em diferentes hospedeiros, por mecanismos ainda desconhecidos, exibindo potencial antigênico e contribuindo com a hipótese levantada de que múltiplos sítios de ligação em um antígeno amplia a probabilidade de detecção aos anticorpos específicos (GOTO et al, 2010).

Este estudo propôs a análise de proteínas com motivos repetitivos de *L. braziliensis*, visando a contribuição em novas alternativas viáveis ao sorodiagnóstico da LT. Entre o painel de proteínas ortólogas avaliado, detectamos duas proteínas (Lci2b e Lci3b) contendo TRM divergentes daqueles encontrados na sequência das proteínas recombinantes ortólogas de *L. infantum* e apresentadas como candidatas a aplicação na sorologia da LV (Oliveira et al, 2011). Nossos resultados, destacam a proteína Lci2b, cinesina K39 de *L. braziliensis*, por apresentar dois grandes motivos repetitivos com múltiplos tandem em 42 e 49 aminoácidos, com uma região repetitiva representando 59,2% da sua sequência composta por 2.155 resíduos, corroborando com análises sistemáticas de proteomas inteiros previamente descritas de que parasitas do gênero *Leishmania* são ricos em proteínas antigênicas com extensos motivos repetitivos (GOTO et al, 2010). Por meio de alinhamento par a par entre a sequência codificadora para proteína Lci2b e a sequência da proteína recombinante Lci2, foi caracterizado homologia na região N-terminal entre as sequências, conferindo conservação entre as espécies e divergindo com seus TRM a partir da sua região central até a extremidade C-terminal, reforçando a hipótese levantada de que um dos possíveis fatores associado a antigenicidade dessas proteínas é não compartilhar características como similaridade completa da sequência (GOTO et al, 2010), impulsionando ainda mais a exploração desse resultado.

A proteína da zona de fixação flagelar, Lci3b, de *L. braziliensis*, assim como a Lci2b, apresentou motivos repetitivos predominantes em sua composição, porém os motivos detectados são menores quando comparados aos encontrados na Lci2b, sendo esses TRM compostos por 14 aminoácidos. Em contraste, a região repetitiva identificada na Lci3b corresponde a 77,0% da sua sequência de 3.658 resíduos, uma porcentagem maior do que a encontrada na sequência da Lci2b que possui motivos

repetitivos grandes. Esta proteína apresenta então TRM menores e mais frequentes quando comparados aos identificados na Lci2b, fortalecendo os resultados descritos previamente em que o número de cópias do motivo repetitivo está associado a afinidade de ligação antígeno-anticorpo (GOTO et al, 2010), fundamentado na cinética de ligação termodinâmica. A análise entre sequências codificantes da proteína Lci3b de *L. braziliensis* com a do antígeno recombinante Lci3 de *L. infantum*, também foi realizada por alinhamento par a par e o resultado indica homologia na região N-terminal desses antígenos, compactuando com a conservação entre espécies.

As análises para a proteína Lci5b, flagelar de *L. braziliensis* e a proteína Lci6b, associada a microtúbulos de *L. braziliensis*, corroboram com o dado encontrado por (GOTO et al., 2008), no qual protozoários da família tripanosomatídeos apresentam grandes motivos de repetição em tandem. Em contraste, os motivos de repetição encontrados na Lci5b e Lci6b, apresentam convergência em pequenos fragmentos com a sequência codificante para proteínas de *L. infantum*, diferindo dos resultados obtidos por (GOTO et al., 2008) no qual os motivos repetitivos divergem e não compartilham de similaridade.

Foram analisadas ainda outras três proteínas de *L. braziliensis* (Lci7b; Lci11b e Lci13b), ortólogas de antígenos recombinantes de *L. infantum* previamente definidos. Para estas proteínas, os resultados demonstram ausência dos motivos repetitivos em *tandem* nas sequências de *L. braziliensis*, corroborando com a ausência de motivos repetitivos ao longo da sequência codificante para as proteínas recombinantes de *L. infantum* (MAGALHAES et al., 2017). Ampliando a análise, foi realizado o alinhamento par a par entre as sequências dessas proteínas com seus respectivos ortólogos, resultando na observação de homologia entre sequências, conferindo conservação e similaridade desde a região N-terminal até a extremidade C-terminal. Potencializando esse resultado a inviabilidade de exploração dessas sequências, também foram observadas as similaridades entre propriedades dos aminoácidos que compõe as sequências conservadas, nas quais apresentam predominância das propriedades opostas às descritas como desejáveis (GOTO et al, 2010) no estímulo a resposta imune específica.

Imunoensaios enzimáticos baseados em proteínas recombinantes têm apresentado potencial em sorodiagnóstico de doenças como a leishmaniose visceral. Corroborando com essa perspectiva, o teste comercial ELISA /S7 (BIOGENE) é baseado em antígeno recombinante destinado a identificação da LV canina,

apresentando alta especificidade e sensibilidade (SILVA et al., 2017). Nesse sentido, métodos computacionais capazes de identificar epítomos específicos de células B para síntese de proteínas recombinantes, assim como os programas utilizados no nosso estudo, torna-se viável por apresentar uma abordagem econômica e permitir a seleção de fragmentos apropriados a aumentar sensibilidade e especificidade do teste (AHMAD et al., 2016). Os nossos resultados apontam epítomos para as proteínas Lci2b e Lci3b com potencial no reconhecimento de células B e células de MHC II. No entanto, os epítomos identificados da Lci3b apresentam maior capacidade do peptídeo ser reconhecido por células B, segundo o *score* obtido, quando comparado aos epítomos identificados da Lci2b.

Dessa forma, a identificação e análise dos antígenos Lci2b e Lci3b sugerem potencial para exploração de suas sequências codificadoras, por apresentar desde motivos repetitivos distintos até predição de epítomos resultando em alta capacidade preditiva ao reconhecimento de anticorpos específicos. Portanto, com base nos resultados obtidos nesse estudo, a abordagem para síntese de proteína quimérica derivada das proteínas nativas de *L. braziliensis* torna-se viável, uma vez que epítomos identificados com alta capacidade de ligação e interação são relatados no presente trabalho, além de apresentarem potencial de estimular a resposta imune com fragmentos de regiões repetitivas, sendo uma alternativa aplicável ao sorodiagnóstico da LT.

7 CONCLUSÃO

- As proteínas ortólogas Lci2b e Lci3b apresentam conservação e motivos repetitivos divergentes, com potencial para exploração de suas sequências.
- As proteínas ortólogas Lci5b e Lci6b apresentam conservação, porém motivos repetitivos homólogos.
- O presente trabalho apresenta dados, como epítomos para células B e MHC II, provenientes das proteínas ortólogas Lci2b e Lci3b que podem contribuir na construção de uma proteína quimérica para aplicação no sorodiagnóstico da leishmaniose tegumentar.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, T. A.; EWEIDA, A. E.; SHEWEITA, S. A. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. **Trials in Vaccinology**, v. 5, p. 71–83, 1 jan. 2016.
- ALMEIDA, T. DE et al. Predictive modeling of sand fly distribution incriminated in the transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and the incidence of Cutaneous Leishmaniasis in the. **Elsevier**, [s.d.].
- ALTENHOFF, A. M.; DESSIMOZ, C. Inferring Orthology and Paralogy. **Methods in Molecular Biology**, v. 855, p. 259–279, 2012.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 35671, 31 maio 2012.
- ARAÚJO, A. R. DE et al. Definition of the main vector of cutaneous leishmaniasis: Ecology and mapping in endemic area of Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 233, p. 106572, 1 set. 2022.
- ARONSON, N. et al. 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). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 24, 1 jan. 2017.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D457, 20 out. 2010.
- BARROSO-FREITAS, A. P. T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383–389, abr. 2009.
- BOGGILD, A. K. et al. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with american cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 1, p. e1–e6, 1 jan. 2010.
- CAVALLIERI, A. C. et al. High titers of anti-*Leishmania* spp. antibodies in apparently healthy dogs in the North Pioneer Mesoregion of the state of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 2, p. e013722, 5 jun. 2023.
- CHULAY, J. D.; BRYCESON, A. D. M. Quantitation of Amastigotes of *Leishmania* Donovanii in Smears of Splenic Aspirates from Patients with Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 3, p. 475–479, 1 maio 1983.

COSTA, S. DA et al. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* sl.(Antunes & Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of. **SciELO Brasil** SM da Costa, M Cechinel, V Bandeira, JC Zannuncio, R Lainson, EF RangelMemórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2007•SciELO Brasil, [s.d.].

CUADRAT, R. R. C. et al. An Orthology-Based Analysis of Pathogenic Protozoa Impacting Global Health: An Improved Comparative Genomics Approach with Prokaryotes and Model Eukaryote Orthologs. **OMICS: a Journal of Integrative Biology**, v. 18, n. 8, p. 524, 8 ago. 2014.

DAME, J. B. et al. Structure of the Gene Encoding the Immunodominant Surface Antigen on the Sporozoite of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Science**, v. 225, n. 4662, p. 587–593, 1984.

DE ARAUJO, A. R. et al. RISK FACTORS ASSOCIATED WITH AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN AN ENDEMIC AREA OF BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, p. 86, 8 dez. 2016.

DE LOS SANTOS, M. B. et al. Sampling is decisive to determination of *Leishmania* (*Viannia*) species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 4, 1 abr. 2024.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, 17 jun. 2015.

DE, S. et al. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, set. 2004.

DE VRIES, H. J. C. et al. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. **SpringerHJC de Vries, HD SchalligAmerican journal of clinical dermatology**, 2022•Springer, v. 23, n. 6, p. 823–840, 1 nov. 2023.

DIOTALLEVI, A. et al. Data on the differentiation among *Leishmania* (*Viannia*) spp., *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Brazilian clinical samples using real-time PCR. **Data in Brief**, v. 28, p. 104914, 1 fev. 2020.

DUARTE, M. C. et al. Proteins selected in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. **Am Soc MicrobiolMC Duarte, DC Pimenta, D Menezes-Souza, RDM Magalhães, JLCP Diniz, LE CostaClinical and Vaccine Immunology**, 2015•Am Soc Microbiol, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, 1 nov. 2015.

EDILEUZA FELINTO DE BRITO, M. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **SciELO BrasilMEF Brito, MS Andrade, F Dantas-Torres, EHG Rodrigues, MP Cavalcanti, AMP Almeida***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2012•**SciELO Brasil**, v. 45, n. 4, p. 425–429, [s.d.].

FAGUNDES SILVA, A. DA; OSWALDO CRUZ ORIENTAÇÃO, F.; KEYLA BELIZIA FELDMAN MARZOCHI ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH, D. A Reação Intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da Leishmaniose tegumentar. 2007.

FORSLUND, K.; PEKKARI, I.; SONNHAMMER, E. L. L. Domain architecture conservation in orthologs. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 326, 5 ago. 2011.

FRANK, F. M. et al. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. **Parasitology**, v. 126, n. Pt 1, p. 31–39, 1 jan. 2003.

FREIRE, M. L. et al. Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 16, n. 5, 1 maio 2021.

GABALDÓN, T.; KOONIN, E. V. Functional and evolutionary implications of gene orthology. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 5, p. 360, maio 2013a.

GALVANI, N. C. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of *Leishmania* antigenic proteins. **Microbial pathogenesis**, v. 162, 1 jan. 2022.

GARCIA, G. et al. Development of a chimeric protein based on a proteomic approach for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **SpringerGC Garcia, AMRS Carvalho, MC Duarte, MFC Silva, FAC Medeiros, EAF Coelho***Applied microbiology and biotechnology*, 2021•**Springer**, v. 105, n. 18, p. 6805–6817, 1 set. 2021.

GOMES, A. H. S. et al. *Leishmania* (V.) *braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 319–324, 1 jul. 2008.

GOMES, C. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **SciELO BrasilICM Gomes, NA de Paula, OO Moraes, KA Soares, AM Roselino, RNR Sampaio***Anais brasileiros de dermatologia*, 2014•**SciELO Brasil**, [s.d.].

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GOTO, Y. et al. Cloning, Characterization, and Serodiagnostic Evaluation of *Leishmania infantum* Tandem Repeat Proteins. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 3939, jul. 2006

GOTO, Y.; CARTER, D.; REED, S. G. Immunological Dominance of *Trypanosoma cruzi* Tandem Repeat Proteins. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 3967, set. 2008.

GOTO, Y.; COLER, R. N.; REED, S. G. Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 846–851, fev. 2007.

GRAŻLEWSKA, W. et al. Epitope Mapping of BmpA and BBK32 *Borrelia burgdorferi* Sensus Stricto Antigens for the Design of Chimeric Proteins with Potential Diagnostic Value. **ACS Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 2160–2172, 10 nov. 2023.

JUÁREZ-SALDIVAR, A. et al. In Silico Analysis of Potential Drug Targets for Protozoan Infections. **Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 91–98, 17 ago. 2022.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.

MAGALHÃES, F. B. et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184867, 1 set. 2017.

MALCHIODI, E. L. et al. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 97, n. 3, p. 417, 1994.

MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121, 1 jun. 2021.

MATTOS, A. B. N. DE; TUMELERO, J. L. Epidemiological profile of cutaneous Leishmaniasis in Brazil, 2015-2020. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 3, p. e17212340385–e17212340385, 6 mar. 2023.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Editor's Choice: Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7, 1 jan. 2014.

MEDEIROS, R. et al. Mapping linear B-cell epitopes of the trypanothione peroxidase and its implications in the serological diagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Elsevier**, [s.d.].

MENEZES-SOUZA, D. et al. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS, B. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. [s.d.].

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. **Acta Tropica**, v. 184, p. 29–37, 1 ago. 2018.

MORGADO, F. N. et al. Dogs Harbor *Leishmania braziliensis* and Participate in the Transmission Cycle of Human Tegumentary Leishmaniasis. **mdpi.com** J Lago, D Fraga, L Coelho, MS Jesus, B Leite, GL Werneck, S Arruda, E Lago, EM Carvalho **Pathogens**, 2023•mdpi.com, 2023.

NASCIMENTO', M. D. S. B. et al. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. **academic.oup.com** MDSB Nascimento, NM Alcântara-Neves, MEB Muniz, SF Nunes, M Paranhos **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1993•academic.oup.com, v. 87, p. 91–93, 1993.

OLIVEIRA, G. G. S. et al. Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025, 12 dez. 2011.

PAGNIEZ, J. et al. A systematic review of peptide-based serological tests for the diagnosis of leishmaniasis. **ncbi.nlm.nih.gov** J Pagniez, E Petitdidier, O Parra-Zuleta, J Pissarra, R Bras-Gonçalves **Parasite**, 2023•ncbi.nlm.nih.gov, [s.d.].

PARANHOS-SILVA, M. et al. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 679–681, 2001.

PAULO, L. B.-R. DO I. DE M. T. DE S.; 2019, UNDEFINED. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? **SciELO Brasil** LMA Braz **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2019•SciELO Brasil, [s.d.].

PINHEIRO, A. B. S. et al. The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

PIYASIRI, S. B. et al. ELISA-based evaluation of antibody response to Leishmania in a region endemic for cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 44, n. 9, 1 set. 2022.

PIYASIRI, S. B. et al. Diagnostic Tools for Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania donovani: A Narrative Review. **Diagnostics**, v. 13, n. 18, 1 set. 2023.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 227–250, 7 jan. 2013.

REIMÃO, J. Q. et al. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–30, 1 nov. 2020.

REIS, S. et al. Intradermorreação de Montenegro em cães (Mammalia: Canidae) experimentalmente inoculados por Leishmaniaguyanensis e Leishmania braziliensis. **SciELO Brasil** SR Reis, RF Naiff, FN Almeida-Campos, AR Franco **Acta Amazonica**, 2008 • **SciELO Brasil**, [s.d.].

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21, jan. 2007.

ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Viannia) guyanensis in Brazil. **Acta tropica**, v. 93, n. 1, p. 49–56, jan. 2005.

SANTOS, W. J. T. et al. Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008488, 27 jul. 2020.

SARKARI, B. et al. Performance of an ELISA and Indirect Immunofluorescence Assay in Serological Diagnosis of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, 2014.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349–358, 1 set. 2003.

SHEIKH, S. S. et al. Leishmaniasis. **Parasitology and Microbiology Research**, 13 fev. 2020.

SILVA, J. D. et al. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1292–1298, 1 nov. 2017.

SILVA, J. G. D. et al. Infecção natural de Lutzomyia longipalpis por Leishmania sp. em Teresina, Piauí, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 7, p. 1715–1720, 2007.

SIVIERO DO VALE, E. C.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421–428, 2005.

SOUZA, A. P. et al. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using Leishmania Recombinant Proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 12 jun. 2013.

SUÁREZ, M. et al. Quantification of Leishmania (Viannia) Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003936, 2015.

SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47–52, 2009.

TABBABI, A. et al. Effects of host species on microbiota composition in Phlebotomus and Lutzomyia sand flies. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, 1 dez. 2023.

TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, out. 2013.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 253, 1 jun. 2020.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, TOBY. J.; HIGGINS, D. G. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 00, n. 1, p. 2.3.1-2.3.22, 1 jan. 2003.

TINOCO-NUNES, B. et al. The sandfly Lutzomyia longipalpis LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and Leishmania. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 20 abr. 2016.

VIEIRA, A.; ROCHA, E.; CORREA DE OLIVEIRA, E. H. ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL DO PARÁ (BRAZIL). **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 3, p. 348–360, 18 out. 2021.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 433–450, 1 set. 1996.