



Preprint

Pertenencia institucional

Resumen

Correspondencia

Palabras clave:

Abstract

ORCID

Key words:

Estrategia de tamizaje para la selección de epítopes de *Leishmania spp* en humanos por medio del análisis de interacciones moleculares: Un acercamiento desde la bioinformática

Screening strategy for the selection of *Leishmania spp* epitopes in humans through molecular interactions analysis: A bioinformatics approach

ResumenIntroducción: La leishmaniasis se manifiesta principalmente como una lesión cutánea en el sitio de la picadura del insecto vector. En Colombia esta enfermedad tiene gran importancia en salud pública. El parásito intracelular se internaliza en vacuolas parasitóforas en macrófagos, por lo que para la eliminación del parásito se necesita la activación por los linfocitos T CD4-Th1 con la producción de IFN γ y la síntesis de Óxido Nítrico en los macrófagos, así que es crítica la presentación antigénica uniendo secuencias cortas del parásito en el bolsillo de las moléculas MHC clase II. Esta interacción puede ser predicha con herramientas bioinformáticas. Por eso, el objetivo fue la identificación de secuencias lineales de proteínas inmunogénicas de *Leishmania (Viannia) spp.* a través de herramientas bioinformáticas frente a moléculas MHC clase II humanas. **Metodología:** se tomaron secuencias lineales de proteínas GP63, HSP70 y PEPCK de *L. panamensis* y se predijo la unión de secuencias de 15 aminoácidos frente a diversos HLA-DR*04 por medio herramientas de predicción. Se confirmó que las regiones fueran altamente conservadas entre las especies del parásito, pero baja o ninguna identidad con proteínas humanas.

Finalmente se analizaron las interacciones de los péptidos con mejores resultados por acoplamiento molecular frente a HLA-DR*04:01. **Resultados:** se obtuvieron 3 secuencias con gran potencial como epítopes T de *Leishmania spp.*

Conclusiones: secuencias GP63₂₆₇₋₂₈₂, GP63₂₈₂₋₂₉₇; y PEPCK₅₃₅₋₅₅₀ pueden inducir una respuesta inmune Th1 en humanos, por lo que pueden ser probados en fases posteriores como candidatos profilácticos o terapéuticos frente a la leishmaniasis.

Palabras clave: Leishmaniasis, epítopes T, HLA-DR, Acoplamiento molecular, bioinformática.

Abstract

Leishmaniasis is a disease that causes a cutaneous lesion where the vector insect bites. In Colombia this disease is a big public health problem. The intracellular parasite invades macrophages parasitophorous vacuole, therefore parasite elimination needs TH1 lymphocyte activation with INF γ production and Nitric Oxide synthesis inside macrophages, so antigen presentation by binding short parasite sequences to MHC class II pocket is critical. Such interactions may be predicted with bioinformatic tools. The aim of this work was to identify linear sequences from immunogenic proteins of *Leishmania (Viannia) spp.* through bioinformatic tools against MHC class II human molecules. Methodology: linear sequences of GP63, HSP70 y PEPCK were taken from *L. panamensis* and binding of 15mer peptides to different HLA-DR*04s were predicted. Highly conserved sequences were selected among the parasite species and null or low identity among human proteins. Finally molecular docking was performed against HLA-DR*04:01 pocket. Results: 3 sequences were identified as potential

Leishmanial T epitopes. Conclusion: GP63₂₆₇₋₂₈₂, GP63₂₈₂₋₂₉₇; and PEPCK₅₃₅₋₅₅₀ peptides could induce a Th1 response in humans and therefore they can be evaluated as prophylactic or therapeutic candidates against leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, T epitopes, HLA-DR, molecular docking, bioinformatic.

Introducción

El género *Leishmania* está conformado por parásitos protozoos intracelulares distribuidos en zonas tropicales y subtropicales del planeta, y con alta relevancia clínica por su capacidad para infectar seres humanos al transmitirse a través de picadura de insectos hematófagos del género *Lutzomyia* para el nuevo mundo. Mundialmente se reportan entre 0,9 y 1,6 millones de casos anualmente en 98 países afectados(1), siendo la presentación cutánea (LC) la forma clínica más prevalente. En el continente americano se presentan alrededor de 64 000 casos anuales siendo Brasil, Perú y Colombia los países que reportan el mayor número de éstos. En Colombia se reportó un promedio de 7 481 casos anuales en la última década, siendo la leishmaniasis cutánea es la forma predominante con más del 98% de los casos, con las especies *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* como las más prevalecientes(1,2).

A nivel inmunológico, para una eficiente eliminación del parásito, se requiere de la activación predominante de linfocitos T helper 1 (Th1) que activen macrófagos (célula blanco del parásito) a través de IFN γ . Por lo anterior, la correcta activación de los linfocitos por parte de la Célula Presentadora de Antígeno (CPA) es primordial. La CPA fagocitan al parásito, procesan sus proteínas en el fagolisosoma y presentan fragmentos (o péptidos) de estas a los linfocitos T CD4+ a través de los Antígenos Leucocitarios Humanos-clase II en la superficie de su membrana, que, junto con el perfil de citocinas del microambiente, inducen la activación y diferenciación celular de los linfocitos Th(3). Este proceso es considerablemente complejo, y se ve gobernado no solo por la naturaleza de las proteínas del parásito y los péptidos producto de su

degradación, sino que también por las características de los HLAs (Antígeno Leucocitario Humano) presentes en el huésped. Es la afinidad entre estos dos últimos la que determina qué secuencias serán presentadas a los linfocitos T, definiendo así el curso de la respuesta inmunológica y el desarrollo -o no- de inmunidad(4,5). Por otro lado, los HLAs son altamente variables entre poblaciones humanas, e incluso entre individuos, lo que implica que el mismo péptido podría no ser inmunogénico en dos poblaciones diferentes.

Dada la gran cantidad de variables que intervienen en las dinámicas inmunológicas entre huésped y el patógeno, resulta difícil cubrir cada una de las posibilidades en modelos experimentales *in vitro/vivo*. Afortunadamente, con el auge del “Machine learning” de las últimas décadas se han creado herramientas bioinformáticas que posibilitan el estudio y la predicción del comportamiento de sistemas biológicos complejos que permiten obtener datos de comportamiento entre moléculas concretas, lo que permite un tamizaje de un gran número de candidatos a unos pocos que posteriormente puedan ser evaluados *in vitro*, optimizando así tiempos, costos y mano de obra en las fases preclínicas de desarrollo de vacunas(6). Para poder aplicar dicho modelo en la búsqueda de una vacuna contra especies del género *Leishmania*, es necesaria la selección de proteínas inmunogénicas de perfil de expresión característico del parásito de modo que, ante la exposición *in vivo*, el hospedero sea capaz de orquestar una respuesta inmune efectiva. A través de herramientas bioinformáticas es posible predecir qué péptidos se unen preferentemente a los HLA-DR, allanando el camino en este campo. Con lo anterior en consideración, la presente investigación tuvo como objetivo identificar *in silico* péptidos de proteínas

inmunogénicas en especies de *Leishmania* prevalentes en Colombia, y su afinidad por HLA-DRs comunes en la población colombiana.

Materiales y métodos

Selección y obtención de datos de proteínas

Se realizó una búsqueda de proteínas en revistas indexadas a través de las plataformas ScienceDirect, Wiley, Nature, Scopus y SpringerLink y se seleccionaron aquellas que cumplieran con los siguientes criterios: *i.* la proteína ha sido caracterizada a nivel de secuencia en el genoma de las tres especies de *Leishmania*; *ii.* La proteína se expresa de forma constitutiva en las dos formas del parásito; *iii.* La proteína tiene actividad inmunogénica probada en literatura; *iv.* la proteína tiene baja identidad con homólogos humanos.

Análisis *In silico*

La secuencia completa de cada proteína fue obtenida en formato FASTA en la base de datos del National Library of Medicine (NCBI). Las proteínas de *L. panamensis* seleccionadas fueron *i)* Glicoproteína de membrana o leishmanolisina - GP63 (AAB97896.1); *ii)* Proteína de Choque Térmico 70 - HSP70 (XP_010700632.1); y *iii)* Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa - PEPCK (XP_010696875.1). A partir de la secuencia lineal de aminoácidos de cada proteína, se realizaron alineamientos múltiples de la secuencia de *L. panamensis* frente a *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *Homo sapiens* por medio de las herramientas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y MUSCLE Multiple Sequence Alignment -EMBL-EBI(7) para confirmar tanto la alta identidad entre las especies de *Leishmania* como la baja identidad con su

homólogo humano respectivamente. La representación de la proteína fue obtenida de la predicción de estructura tridimensional generada por AlphaFold(8,9). La edición de las figuras fue realizada con el software Pymol(10).

Predicción de unión de péptidos y HLA-DR:

Las secuencias lineales de cada proteína fueron analizadas por dos herramientas de predicción de epítopes T diferentes, NetMHCIIpan(11) y MixMHC2pred(12), dos herramientas validadas en su capacidad para predecir la interacción entre péptidos y alelos MHC. Cada una de estas herramientas realizó predicciones de unión de secuencias de 15 aminoácidos a lo largo de toda la proteína frente a los siguientes 11 alelos de HLA-DR04: DRB1_04:01, DRB1_04:02, DRB1_04:03, DRB1_04:04, DRB1_04:05, DRB1_04:06, DRB1_04:07, DRB1_04:08, DRB1_04:10, DRB1_04:11, y DRB1_04:17(13).

Preparación del receptor (HLA-DR4) y péptidos derivados de las proteínas GP63 y PEPCK.

La proteína HLA-DR4 (4mdj) fue descargada de Protein data bank (<https://www.rcsb.org/structure/4MDJ>) y preparada en Atuodock vina y DStudio visualizer (BIOVIA., <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). Para esto, al receptor se le removieron los ligandos presentes, las moléculas de agua y se le adicionaron fuerzas de Kollman y atomos polares; adicionalmente, fue revisada manualmente, para determinar el bolsillo de unión y la estructura secundaria. El archivo fue depositado en formato PDB, para su posterior uso en el acoplamiento molecular.

Los péptidos generados por las herramientas anteriores fueron modelados por medio de la herramienta PEP-FOLD V.4.5 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) y los archivos generados, fueron almacenados en formatos PDB para su uso. Se seleccionaron los mejores modelos, basados en el análisis de Ramachandran Plots y en su índice de toxicidad (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/algo.php>).

Acoplamiento molecular HLA-DR4: péptidos derivados de proteínas

Se llevó a cabo el acoplamiento molecular, por medio de la herramienta MDOckPEP (<https://zougrouptoolkit.missouri.edu/mdockpep/index.html>) (14), en donde se usó como receptor la proteína HLA-DR4 preparada previamente y las secuencias peptídicas generadas. Se seleccionaron los mejores modelos de interacción (-Kj/mol) por cada péptido evaluado y se identificaron las propiedades de unión como el número de interacciones favorables y no favorables, la totalidad de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes de sal, que le otorgan al complejo, la estabilidad (térmica, pH y electrostáticas), por medio de DStudio visualizer.

Resultados

El proceso inicial de tamizaje constó de 3 fases. Primero la identificación de secuencias como posibles epítopes T de *Leishmania* mediante la evaluación de unión de cada secuencia a diferentes alelos de HLA-DR β *04 comunes en la población colombiana mediante la predicción por dos herramientas bioinformáticas que funcionan con algoritmos diferentes. Para esta identificación se tomó la secuencia FASTA de cada proteína y se fragmentó para obtener péptidos de 15 aminoácidos, tal

que el primer péptido va de la posición 1 a 15, el segundo péptido va de la posición 2 a 16, etc. De la proteína GP63 se obtuvieron 575 secuencias, de la HSP70 se obtuvieron 640 secuencias, y de la PEPCK se obtuvieron 584 secuencias, para un total de 1799 secuencias. Todas estas secuencias fueron evaluadas contra 10 alelos de HLA-DR β *04 a través de las herramientas NetMHCIIpan y MixMHC2pred, para un total de 39578 predicciones. El punto de corte seleccionado para ambas herramientas en este estudio fue %Rank $\leq$ 1, que quiere decir que, entre más pequeño su valor, mayor afinidad de unión del péptido en estudio comparado con otras secuencias al azar. Las secuencias que mostraron unión fuerte por varios alelos simultáneamente por las 2 herramientas empleadas fueron seleccionados como potenciales epítopes T. Estas seis secuencias, tres provienen de la proteína GP63, una secuencia de HSP70 y dos secuencias de PEPCK (Ver Tabla 1).

La segunda fase consistió en la comparación de la secuencia de estos péptidos con su proteína homóloga de otras especies de *Leishmania* causantes de leishmaniasis cutánea en el nuevo mundo. La identidad de las secuencias estuvo en el rango entre 93% y 100%, señalando así que estas regiones son altamente conservadas entre las especies y estos epítopes podrían tener protección cruzada entre especies (Ver Gráfica 1, 2, 3 y Tabla 1). En la tercera fase, cada secuencia se comparó contra proteínas humanas para descartar o tolerancia o riesgo de inducción de autoinmunidad, en donde la identidad de cada péptido con proteínas humanas estuvo entre 0% y 93%, resaltando que aquellas secuencias que superan el 50% de identidad no continúan como candidatos vacunales. Como resultado de este tamizaje 4 secuencias cumplen con las condiciones planteadas que son GP63₂₆₇₋₂₈₂, GP63₂₈₂₋₂₉₇, PEPCK₂₅₁₋₂₆₆ y PEPCK₅₃₅₋₅₅₀.

Con estas 4 secuencias se procedió a realizar el acoplamiento molecular (Acoplamiento molecular) de cada una de ellas frente al bolsillo de la proteína HLA-DR β 04:01 para validar la unión fuerte de las secuencias a dicho alelo. La Tabla 2 muestra la energía de interacción entre el receptor y el péptido del mejor modelo seleccionado.

La Tabla 2 muestra que el péptido PEPCK₂₅₁₋₂₆₆ tiene la menor energía de interacción (expresada como Kcal/mol), seguido muy de cerca por GP63₂₆₇₋₂₈₂, lo que se correlaciona con un mayor número de interacciones favorables entre el receptor y el ligando, es decir, es una medida indirecta de la fuerza y estabilidad de la unión, seguido los que mostraron menores energías de interacción fueron PEPCK₅₃₅₋₅₅₀ y GP63₂₈₂₋₂₉₇.

Las fuerzas que interactúan entre la proteína y el ligando pueden ser fuerzas que permiten la unión de las moléculas, la estabilidad de estas o pueden ser fuerzas desfavorables o de repulsión entre los aminoácidos, así las uniones favorables más fuertes son los puentes de hidrógeno, seguidos por las interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas. En las Gráficas 4 A-D se muestran en detalle los acoplamientos moleculares en donde podemos observar que los residuos ASN62 y ASN69 en la cadena alfa generalmente generan uniones de tipo HB (puentes de Hidrógeno) con aminoácidos en el ligando y los residuos TRP61, HIS81, ILE67 e HIS13 en la cadena beta son importantes para la unión de ligandos en el bolsillo de HLA-DR β *04 generando uniones favorables, especialmente HB.

Por el lado del péptido, los aminoácidos interactúan principalmente con residuos polares del bolsillo y aunque se espera que la secuencia se ubique dentro del bolsillo en dirección N-terminal a C-terminal, PEPCK₂₅₁₋₂₆₆ se unió a este en sentido contrario. Los péptidos evaluados mostraron la capacidad de unión al bolsillo con diversas interacciones con ambas cadenas y mínimas fuerzas desfavorables o de repulsión, lo que permitiría una unión estable el tiempo suficiente para que pueda haber una activación de la respuesta inmune.

Discusión

En principio, las proteínas seleccionadas han sido evaluadas previamente por múltiples equipos de investigación en varias especies de *Leishmania*. Gracias a esto se ha podido determinar su potencial inmunogénico, o, dicho de otro modo, su capacidad para estimular el desarrollo de inmunidad a partir de la presentación antigénica de GP63(15) y PEPCK(16,17). Vale la pena resaltar que la respuesta inmune mediada por anticuerpos es poco efectiva en el control de *Leishmania*, por lo que el diseño de estrategias profilácticas y terapéuticas no se basan en la identificación de anticuerpos ni epítopes B sino en la identificación de secuencias que puedan inducir una presentación antigénica y por lo tanto activación de células T principalmente CD4⁺ es decir, secuencias cortas y lineales que sean presentadas a través de las moléculas del complejo Mayor de Histocompatibilidad-MHC (18,19).

El tamizaje planteado en este estudio permite que paso a paso se reduzcan el número de secuencias candidatas a la vez que va aumentando la probabilidad de éxito de las secuencias tanto en capacidad de inducción de la respuesta inmune para una amplia gama de especies infectantes como en seguridad. Es indispensable desde las fases preclínicas iniciales del desarrollo de productos farmacéuticos basados en proteínas

que no haya similitud con las proteínas humanas pues generaría o tolerancia inmunológica o el riesgo de inducción de una condición autoinmune. Esta estrategia podría ser empleada con diversas proteínas, en diversas poblaciones y frente a diferentes agentes infecciosos que requieran una respuesta inmune celular similar a *Leishmania*, por ejemplo, aquellos patógenos que usan al macrófago como su célula blanco.

El acoplamiento molecular posterior puede ser empleado como una herramienta de predicción de afinidad de proteínas y secuencias peptídicas, pues evidencia las interacciones y tipos de uniones que ocurren entre el bolsillo de las moléculas del CMH y los ligandos. Estas interacciones han mostrado estar involucradas en la unión estable entre péptidos y moléculas MHCII que pueden brindar estabilidad a la interacción (20,21). Así, la selección de candidatos después del acoplamiento molecular se hace más fina y precisa, sin embargo, en las bases de datos hay una baja disponibilidad de moléculas del CMH humanas generadas por rayos-X o NMR, lo que limita los resultados a pocas isoformas disponibles. Prueba de esto puede encontrarse en otras investigaciones que han tomado el enfoque de predicción para la validación de distintos constructos *in silico* propuestos como vacunas partiendo de las mismas proteínas empleadas en este estudio. La diferencia radica en las distintas isoformas de MHCs utilizadas, que incluyen diferentes HLADRs, moléculas de MHCI e incluso homólogos en ratones, obteniendo péptidos con secuencias distintas(22,23). Esto no resulta extraño dada la naturaleza de las interacciones inmunes.

Por lo anterior, esta estrategia de tamizaje permite un acercamiento a secuencias que pueden ser candidatos a vacunas y generar una respuesta inmune adecuada, sin embargo, es necesario validar dicha utilidad posteriormente con experimentación *in vitro* o *ex vivo* usando directamente células humanas.

Conclusión

A partir de las secuencias de 3 proteínas GP63, HSP70 y PEPCK se obtuvieron 1796 secuencias lineales de 15 aminoácidos a lo largo de la longitud total de las mismas. Después del primer filtro y predicciones bioinformáticas obtuvimos 6 secuencias que cumplieron los criterios de selección, y de estas solo 4 pasaron el segundo y tercer filtro de homología y seguridad. Finalmente, después del análisis por acoplamiento molecular podemos concluir que GP63₂₆₇₋₂₈₂, GP63₂₈₂₋₂₉₇; y PEPCK₅₃₅₋₅₅₀ representan secuencias que tienen alta probabilidad de ser epítopes naturales de *Leishmania* y desencadenar respuestas en linfocitos T CD4⁺ que puedan conllevar a un control de la replicación del parásito más eficiente por parte del macrófago y de esta manera convertirse en alternativas a profilaxis o tratamiento inmunomodulador frente a leishmaniasis. Estas tres secuencias son valiosas para la comprobar su utilidad en experimentos *in vitro*.

Agradecimientos: Al programa Delfín por favorecer el intercambio de estudiantes entre diferentes instituciones durante el verano de 2023 que permitió avances en el desarrollo de este trabajo.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no hubo conflictos de intereses en el desarrollo del presente trabajo.

Financiación: Universidad Cooperativa de Colombia proyecto INV3340.

Referencias

1. Leishmaniasis [Internet]. [cited 2025 May 5]. Available from: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1
2. Instituto Nacional de Salud. Sistema de Vigilancia SIVIGILA [Internet]. [cited 2022 Jun 16]. Available from: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Paginas/SIVIGILA.aspx>
3. Costa-Da-silva AC, Nascimento D de O, Ferreira JRM, Guimarães-Pinto K, Freire-De-lima L, Morrot A, et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Trop Med Infect Dis* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Dec 3];7(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35448829/>
4. Scott P. Long-lived skin-resident memory T cells contribute to concomitant immunity in cutaneous leishmaniasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2025 May 5];12(10):1–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32839202/>
5. Kedzierski L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis* [Internet]. 2010 [cited 2023 Dec 3];2(2):177. Available from: [/pmc/articles/PMC2889658/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21333759/)
6. Liao WWP, Arthur JW. Predicting peptide binding to Major Histocompatibility Complex molecules. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2011 Jun [cited 2025 May 5];10(8):469–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21333759/>
7. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2024 Jan 25];32(5):1792–7. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
8. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021 596:7873 [Internet]. 2021 Jul 15 [cited 2025 May 15];596(7873):583–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2>
9. Varadi M, Bertoni D, Magana P, Paramval U, Pidruchna I, Radhakrishnan M, et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2024 Jan 5 [cited 2025 May 15];52(D1):D368–75. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkad1011>
10. PyMOL | pymol.org [Internet]. [cited 2025 May 15]. Available from: <https://pymol.org/>
11. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Peters B, et al. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. *J Proteome Res*. 2020 Jun 5;19(6):2304–15.
12. Racle J, Guillaume P, Schmidt J, Michaux J, Larabi A, Lau K, et al. Machine learning predictions of MHC-II specificities reveal alternative binding mode of class II epitopes. *Immunity* [Internet]. 2023 Jun 13 [cited 2024 Sep 3];56(6):1359–1375.e13. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761323001292/fulltext>
13. Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Santos EJM Dos, Jones J, Takeshita L, Ortega-Rivera ND, et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Mar 4];48(D1):D783–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31722398/>
14. Xu X, Yan C, Zou X. MDockPeP: An ab-initio protein–peptide docking server. *J Comput Chem* [Internet]. 2018 Oct 30 [cited 2024 Jan 24];39(28):2409–13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcc.25555>
15. Jamal F, Shivam P, Kumari S, Singh MK, Sardar AH, Pushpanjali, et al. Identification of Leishmania donovani antigen in circulating immune complexes of visceral leishmaniasis subjects for diagnosis. *PLoS One* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2025 May 13];12(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28820895/>

16. Mou Z, Li J, Boussoffara T, Kishi H, Hamana H, Ezzati P, et al. Identification of broadly conserved cross-species protective *Leishmania* antigen and its responding CD4+ T cells. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015 Oct 21 [cited 2025 May 13];7(310). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26491077/>
17. Barazandeh AF, Mou Z, Ikeogu N, Mejia EM, Edechi CA, Zhang WW, et al. The Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Is a Key Metabolic Enzyme and Critical Virulence Factor of *Leishmania major*. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2025 May 13];206(5):1013–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33462138/>
18. Elmahallawy EK, Alkhalidi AAM, Saleh AA. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomedicine and Pharmacotherapy* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 May 13];139. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33957562/>
19. Ikeogu NM, Akaluka GN, Edechi CA, Salako ES, Onyilagha C, Barazandeh AF, et al. *Leishmania* immunity: Advancing immunotherapy and vaccine development. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2025 May 13];8(8):1–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32784615/>
20. McFarland BJ, Beeson C. Binding interactions between peptides and proteins of the class II Major Histocompatibility Complex. *Med Res Rev* [Internet]. 2002 [cited 2025 May 13];22(2):168–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11857638/>
21. Ferrante A. For many but not for all: How the conformational flexibility of the peptide/MHCII complex shapes epitope selection. *Immunol Res* [Internet]. 2013 May [cited 2025 May 13];56(1):85–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22753017/>
22. Ferreira-Sena EP, Hardoim D de J, Cardoso F de O, d'Escoffier LN, Soares IF, Carvalho JPR da S, et al. A New Strategy for Mapping Epitopes of LACK and PEPCK Proteins of *Leishmania amazonensis* Specific for Major Histocompatibility Complex Class I. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 May 13];24(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36983046/>
23. Saha S, Vashishtha S, Kundu B, Ghosh M. In-silico design of an immunoinformatics based multi-epitope vaccine against *Leishmania donovani*. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 May 13];23(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35931960/>

Cuadros y figuras

Tabla 1: Secuencias con unión fuerte a diversos alelos de HLA-DR β *04

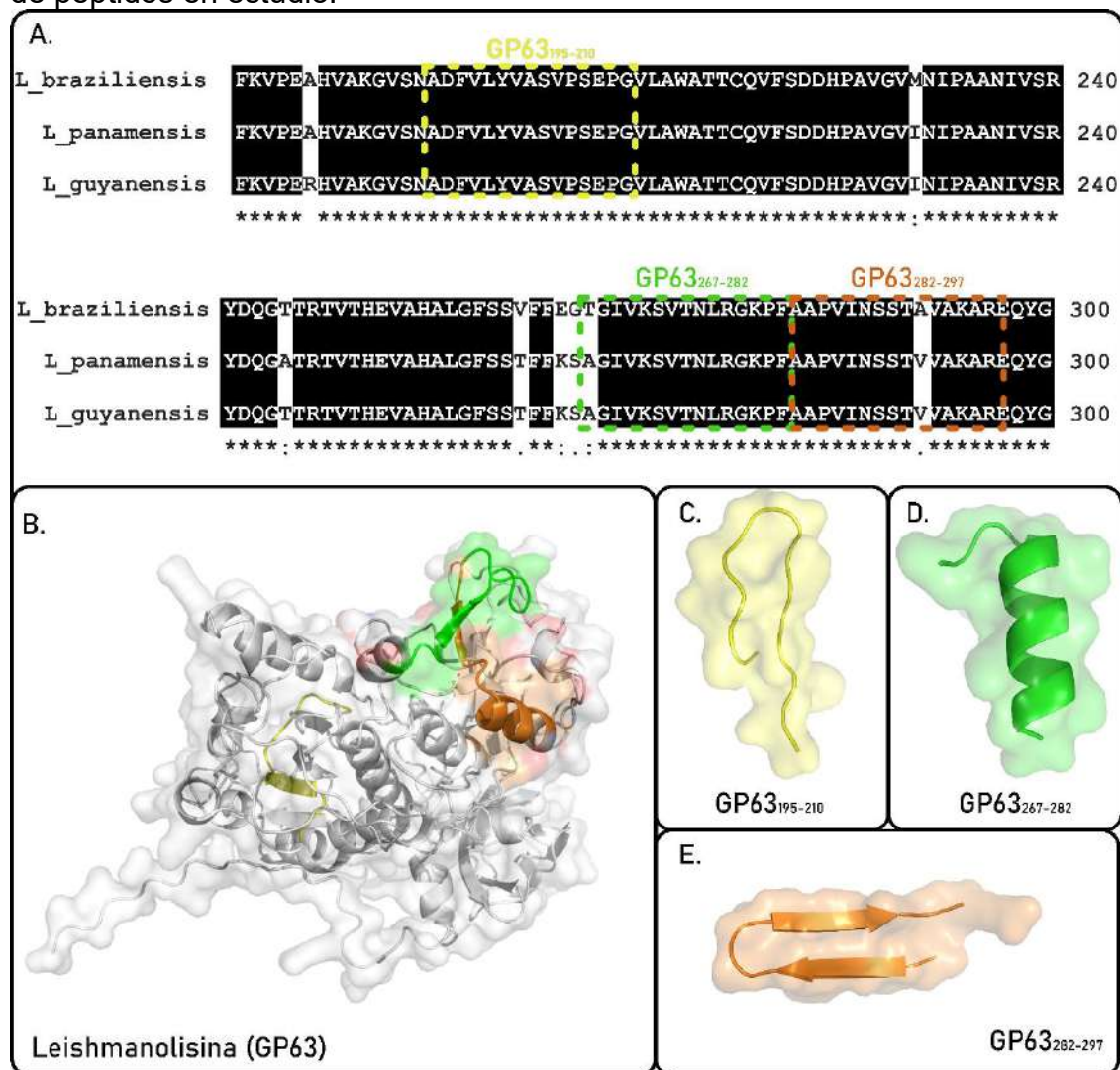
#	Código	Secuencia	Alelo de HLA-DR β con unión fuerte (rank $\leq$ 1%)		% identidad con especies de <i>Leishmania</i>	% identidad con proteína humana
			NETMHCIIpan	MixMHC2pred		
1	GP63 ₁₉₅₋₂₁₀	ADFVLYVASVPS EPG	0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411, 0417	0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	100%	53%
2	GP63 ₂₆₇₋₂₈₂	AGIVKSVTNLRG KPF	0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	93.3%	20%
3	GP63 ₂₈₂₋₂₉₇	AAPVINSSTVVAK AR	0401, 0402, 0404	0401, 0402, 0403, 0404, 0406, 0407, 0411.	93.3%	26.6%
4	HSP70 ₁₆₉₋₁₈₄	EVLRIINEPTAAAI A	0401, 0402, 0403, 0404, 0406, 0407, 0408, 0410	0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	100%	93%
5	PEPCK ₂₅₁₋₂₆₆	ATPYRIITDNPTH AY	0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411, 0417	0401, 0404, 0407, 0408	100%	NS
6	PEPCK ₅₃₅₋₅₅₀	DVVIIGEGTDAAA AI	0401, 0403, 0404, 0406, 0407, 0408.	0401, 0402, 0403, 0404, 0406, 0407, 0408	100%	NS

NS: No homología significativa

Tabla 2. Energía de interacción por Acoplamiento molecular

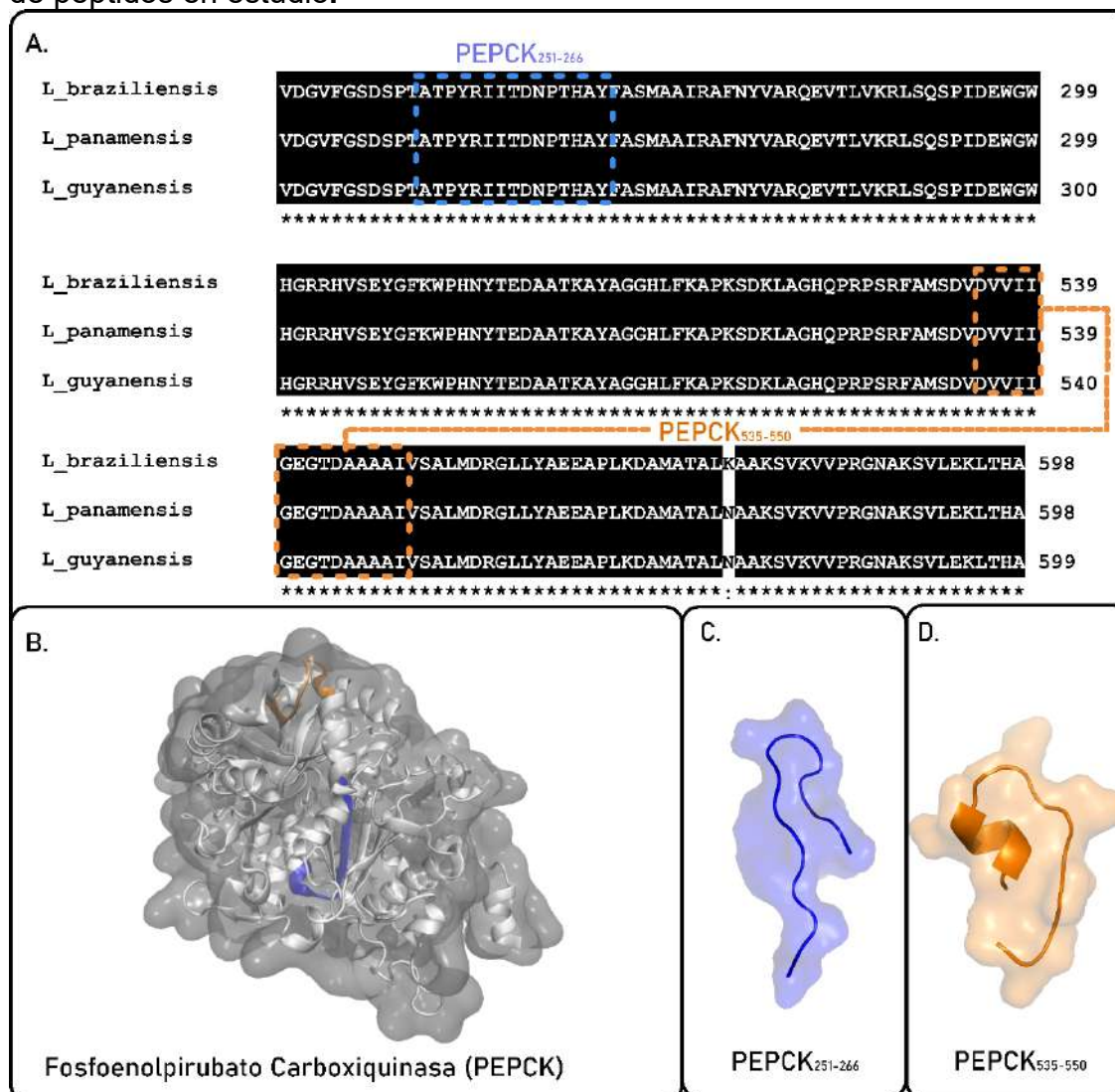
Péptido	Energía de interacción (kCal/mol)	Orientación de unión al bolsillo
GP63 ₂₆₇₋₂₈₂	-9,31	N-terminal a C-terminal
GP63 ₂₈₂₋₂₉₇	-8,6	N-terminal a C-terminal
PEPCK ₂₅₁₋₂₆₆	-9,4	C-terminal a N-terminal
PEPCK ₅₃₅₋₅₅₀	-8,71	N-terminal a C-terminal

Gráfica 1: alineamiento de proteína GP63 entre especies de *Leishmania* y ubicación de péptidos en estudio.



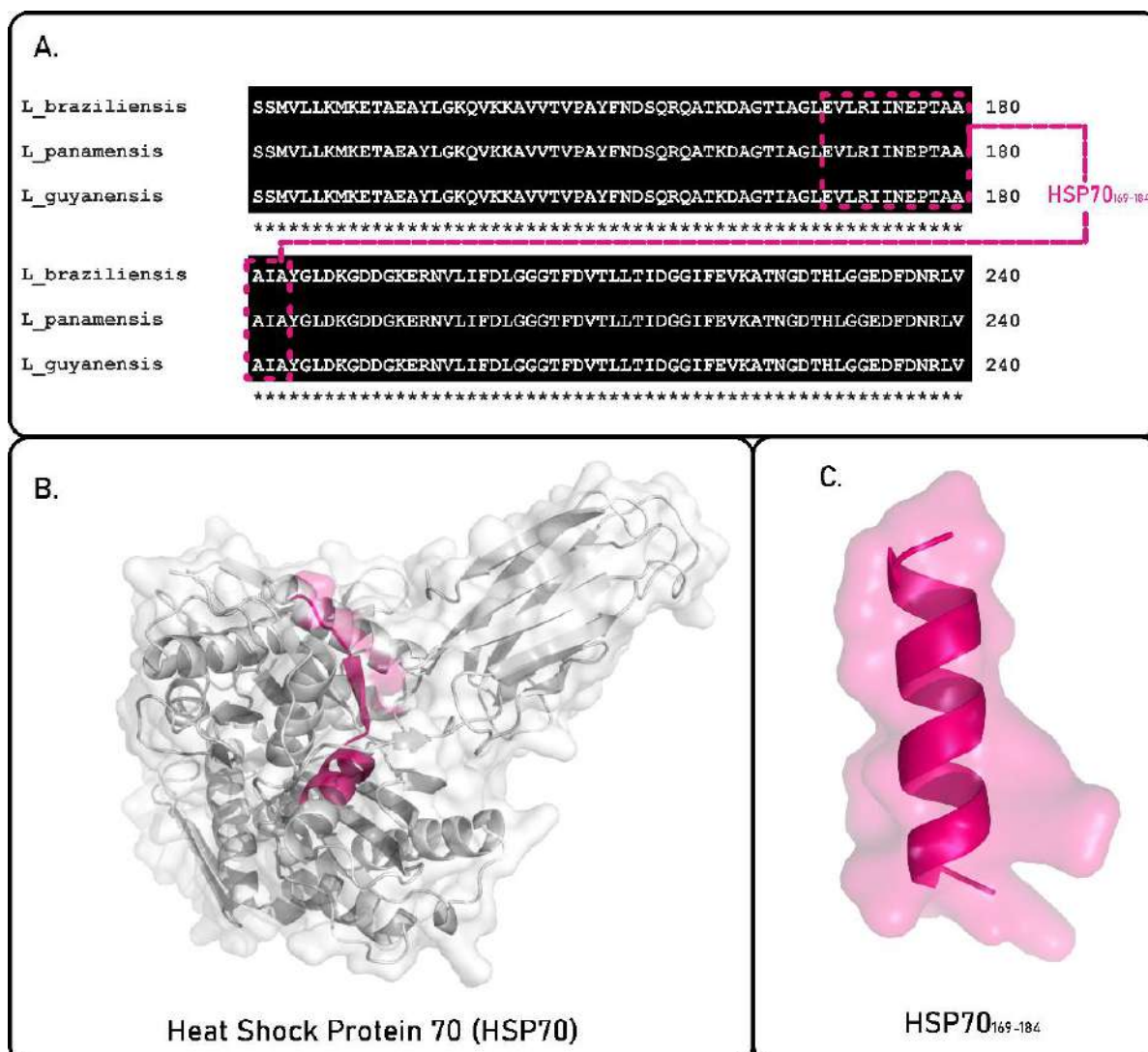
A) Alineamiento múltiple entre GP63 de *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. En recuadros línea punteada la ubicación de los péptidos en estudio. "*" indica identidad entre las secuencias. "." indica cambio de aminoácido por otro con características fisicoquímicas similares y ":" Cambio por aminoácido con características fisicoquímicas diferentes. B) Estructura 2D de la proteína GP63 señalando la ubicación de los péptidos. C, D y E modelo 3D de los péptidos GP63₁₉₅₋₂₁₀, GP63₂₆₇₋₂₈₂ y GP63₂₈₂₋₂₉₇ respectivamente.

Gráfica 2: alineamiento de proteína PEPCK entre especies de *Leishmania* y ubicación de péptidos en estudio.



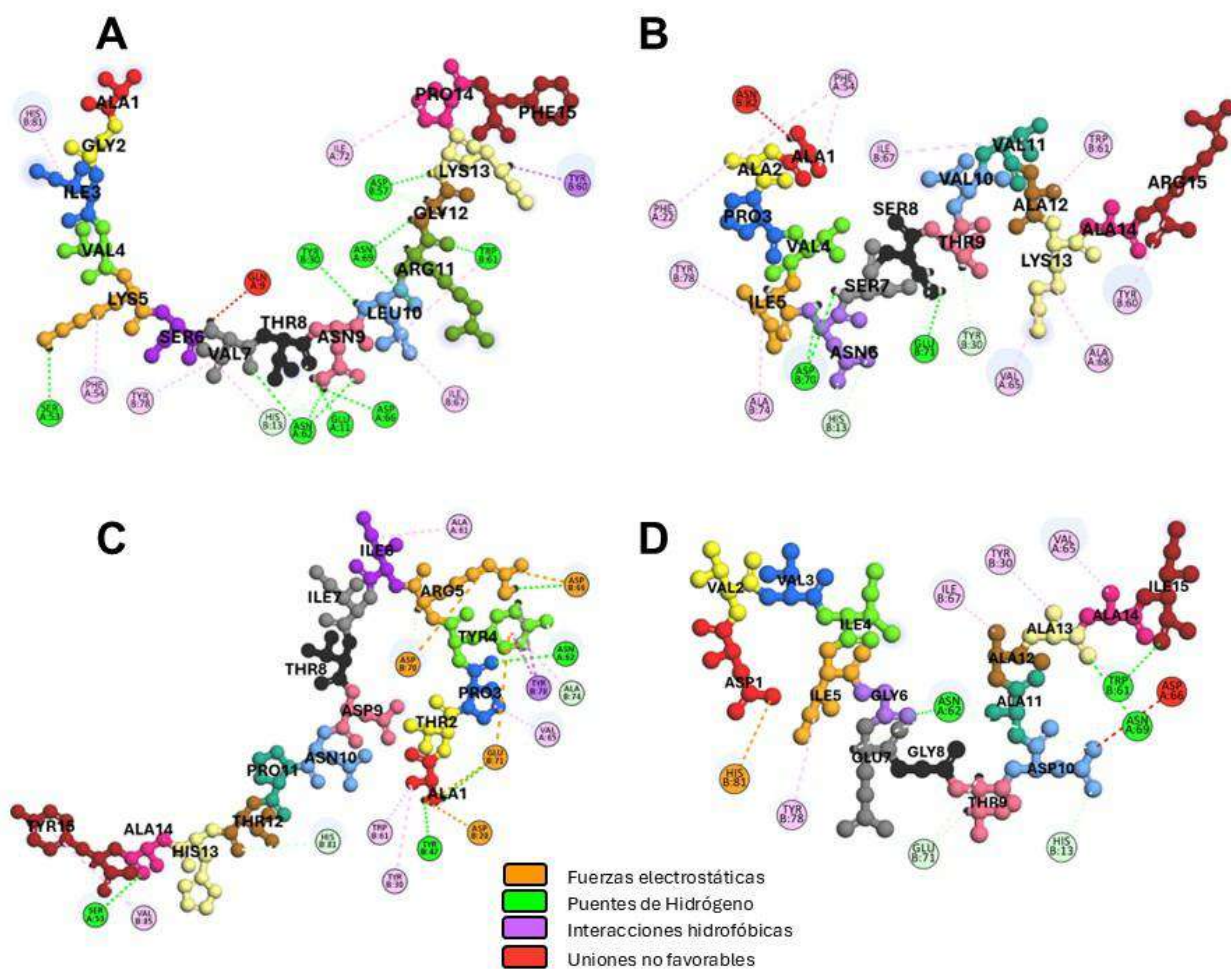
A) Alineamiento múltiple entre PEPCK de *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. En recuadros línea punteada la ubicación de los péptidos en estudio. "*" indica identidad entre las secuencias. "." indica cambio de aminoácido por otro con características fisicoquímicas similares y "." Cambio por aminoácido con características fisicoquímicas diferentes. B) Estructura 2D de la proteína PEPCK señalando la ubicación de los péptidos. C y D modelo 3D de los péptidos PEPCK₂₅₁₋₂₆₆, y PEPCK₅₃₅₋₅₅₀ respectivamente.

Gráfica 3: alineamiento de proteína HSP70 entre especies de *Leishmania* y ubicación de péptidos en estudio.



A) Alineamiento múltiple entre HSP70 de *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. En recuadros línea punteada la ubicación de los péptidos en estudio. "*" indica identidad entre las secuencias. ":" indica cambio de aminoácido por otro con características fisicoquímicas similares y "." Cambio por aminoácido con características fisicoquímicas diferentes. B) Estructura 2D de la proteína HSP70 señalando la ubicación de los péptidos. C) modelo 3D del péptido HSP70₁₆₉₋₁₈₄.

Gráfica 4: Acoplamiento molecular.



A) GP63₂₆₇₋₂₈₂, B) GP63₂₈₂₋₂₉₇; C) PEPCK₂₅₁₋₂₆₆; D) PEPCK₅₃₅₋₅₅₀.