



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM  
Facultad de Ciencias de la Vida  
Ingeniería en Biotecnología

*Diseño de una vacuna candidata de múltiples epítomos  
contra la leishmaniasis cutánea mediante herramientas  
inmunoinformáticas*

Andrea Lisseth Soria Merchán  
24 de febrero de 2021, ciudad de Tena, Napo, Ecuador

## Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 24 de febrero de 2021

Yo, Andrea Lisseth Soria Merchán con documento de identidad N° 1725090276, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniera en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

ii

Firma:



---

Andrea Lisseth Soria Merchán

## **Certificado de dirección de trabajo de integración curricular**

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Diseño de una vacuna candidata de múltiples epítomos contra la leishmaniasis cutánea mediante herramientas inmunoinformáticas”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Andrea Lisseth Soria Merchán, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 24 de febrero de 2021

Firma:


JOSE  
RAFAEL  
DE  
ALMEIDA

Firmado digitalmente por  
JOSE RAFAEL DE  
ALMEIDA  
Fecha: 2021.02.24  
15:01:13 -05'00'

.....

José Rafael De Almeida, PhD.  
C.I: 1757448954

Firma:

 Firmado electrónicamente por:  
**YEIMY MARLENE  
ROJAS DE  
HIDALGO**

.....

Yeimy Marlene Rojas De Hidalgo, MSc.  
C.I: 1757847783

## TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA	
DERECHO DE AUTOR .....	ii
CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES .....	iii
TABLA DE CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE TABLAS.....	vi
ÍNDICE ANEXOS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	10
1.1    Antecedentes.....	10
1.2    Planteamiento del problema .....	14
1.3    Justificación de la investigación .....	15
1.4    Objetivos de la investigación .....	16
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	16
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS .....	24
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	46
REFERENCIAS .....	47
ANEXOS.....	55

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	7
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	10
1.1 Antecedentes .....	10
1.2 Planteamiento del problema .....	14
1.3 Justificación de la investigación.....	15
1.4 Objetivos de la investigación .....	16
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	16
2.1 Selección de epítomos conservados.....	16
2.2 Predicción de epítomos de antígenos potenciales altamente conservados en <i>Leishmania</i> .....	18
2.3 Cálculo de cobertura poblacional, toxicidad y conservación por epítomo .....	19
2.4 Construcción de secuencia de vacuna multi-epítomo.....	19
2.5 Predicción de propiedades de la construcción multi-epítomo.....	20
2.6 Predicción de estructura de construcción multi-epítomo.....	21
2.7 Acoplamiento de multi-epítomo con receptores TLR.....	22
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS .....	24
3.1 Análisis de epítomos conservados .....	24
3.2 Análisis de antígenos candidatos para la predicción de epítomos.....	29
3.3 Cálculo de cobertura poblacional, toxicidad y conservación por epítomo .....	31
3.4 Construcción de secuencia de vacuna multi-epítomo.....	31
3.5 Evaluación de vacuna multi-epítomo .....	33
3.6 Predicción de estructura de construcción multi-epítomo.....	33
3.7 Acoplamiento de multi-epítomo con el receptor TLR-4 .....	35
3.8 Simulación de dinámica molecular .....	37
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	46
REFERENCIAS .....	47
ANEXOS.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reconocimiento general del patógeno y descripción de la respuesta inmunitaria. ....	12
Figura 2. Diagrama de flujo del estudio inmunoinformático diseñado. ....	23
Figura 3. Número de epítomos reportados para antígenos de <i>Leishmania</i> en IEDB. ....	24
Figura 4. Diagrama del diseño multi-epítomo. ....	32
Figura 5. Simulación inmunológica <i>in silico</i> del péptido multi-epítomo. ....	34
Figura 6. Estructura y validación de la vacuna multi-epítomo. ....	36
Figura 7. Interacción molecular de la vacuna candidata con los receptores. ....	37
Figura 8. Simulación de dinámica molecular del complejo acoplado TLR2 y vacuna ....	38
Figura 9. Simulación de dinámica molecular del complejo acoplado TLR4 y vacuna ....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas de <i>Leishmania</i> utilizadas como antígenos candidatos para el cribado de epítomos. ....	25
Tabla 2. Epítomos conservados obtenidos por la superposición de los epítomos colectados respecto a los fragmentos conservados. ....	26
Tabla 3. Afinidad de unión a HLA-I para epítomos conservados de T CD8+ de <i>Leishmania</i> ..... .....	27
Tabla 4. Afinidad de unión a HLA II y puntuación de IFN- $\gamma$ de epítomos conservados de T CD4 + de <i>Leishmania</i> ..... .....	28
Tabla 5. Proteínas de <i>Leishmania</i> utilizadas como antígenos candidatos para la predicción de epítomos. ....	29
Tabla 6. Afinidad de unión a HLA I, puntuación total y puntuación de inmunogenicidad de epítomos predichos de <i>Leishmania</i> ..... .....	30
Tabla 7. Afinidad de unión a HLA II, puntuación total y puntuación de inmunogenicidad de epítomos predichos de <i>Leishmania</i> ..... .....	30

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cantidad de epítomos por especie de <i>Leishmania</i> recuperados de IEDB.....	55
Anexo 2. Fragmentos conservados obtenidos por el análisis de variabilidad de secuencia de los MSA de los antígenos GP63, KMP11 3'NT/UN.....	55
Anexo 3. Fragmentos conservados obtenidos por el análisis de variabilidad de secuencia de los MSA de los antígenos H2B, PSA, LmIRAB.....	56
Anexo 4. Epítomos afines a HLA-I utilizados para diseñar la construcción de vacuna basada en múltiples epítomos .....	56
Anexo 5. Epítomos HLA-II utilizados para diseñar la construcción de vacuna basada en múltiples epítomos .....	57
Anexo 6. Búsqueda de la distribución de haplotipos HLA en Allele Frequency Net para los cuales varios epítomos estudiados mostraron afinidad .....	58
Anexo 7. Propuestas para el diseño final de la vacuna de múltiples epítomos .....	59
Anexo 8. Análisis en BLAST de homología de la secuencia multiepítome con proteínas humanas. ....	60
Anexo 9. Representación de la estructura secundaria de la secuencia de múltiples epítomos. ....	60
Anexo 10. Puntuación GalaxyRefine de todos los modelos refinados previstos. ....	61
Anexo 11. Clasificación de los 10 mejores modelos de acoplamiento multiepítome-TLR2 refinados por FireDock. ....	61
Anexo 12. Clasificación de los 10 mejores modelos de acoplamiento multiepítome-TLR4 refinados por FireDock .....	61

## RESUMEN

La leishmaniasis es una de las principales enfermedades desatendidas del mundo. De las manifestaciones clínicas de la enfermedad, la leishmaniasis cutánea tiene la prevalencia más alta, especialmente en Latinoamérica. El tratamiento actual se basa en la quimioterapia, que es difícil de administrar, costosa e ineficaz por la aparición de farmacorresistencia. El desarrollo y la administración de una vacuna podría representar uno de los medios más rentables para controlar esta enfermedad. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de una vacuna. Los avances recientes en inmunoinformática podrían ser un enfoque prometedor para identificar candidatos a vacunas debido a que son una alternativa menos costosa y más óptima respecto a los esfuerzos experimentales.

Se diseñó un péptido de vacuna de múltiples epítomos que consta de epítomos lineales afines a HLA-I y HLA-II de antígenos y epítomos reportados con potencial inmunogénico. Los epítomos empleados para el diseño mostraron inmunogenicidad, alta conservación, no toxicidad y la combinación de estos logró el 93.61% de cobertura poblacional a nivel mundial. La calidad general de la vacuna se validó por las evaluaciones de alergenicidad, antigenicidad y parámetros fisicoquímicos. El acoplamiento y simulación de dinámica molecular del multi-epítome con los receptores TLR y HLA demostraron una posible interacción y estabilidad de los complejos. Además, la simulación inmune predijo niveles significativamente altos de INF- $\gamma$  e IL-2 y poblaciones de células T-helper, T-citotóxicos. Aunque los resultados sugieren que el diseño propuesto es comparable a otras investigaciones *in silico*, se requiere de evaluaciones *in vitro*.

Palabras claves: vacuna multiepítomo, inmunoinformática, leishmaniasis cutánea



## ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the world's most neglected diseases. Among the clinical manifestations of this disease, cutaneous leishmaniasis has the highest prevalence, especially in Latin America. Current treatment is based on chemotherapy, which is difficult to administer, expensive and becoming ineffective due to drug resistance. The development and administration of a vaccine could represent one of the most cost-effective means of controlling this disease. However, to date no vaccine is available. Recent advances in immunoinformatics could be a promising approach to identifying vaccine candidates because these are a less expensive and optimal alternative compared to experimental efforts.

A multiple epitope vaccine peptide was designed, consisting of linear epitopes binding HLA-I and HLA-II molecules of reported antigens and epitopes with immunogenic potential. Epitopes used for the design showed immunogenicity, high conservation, non-toxicity and the combination of these achieved 93.61% population coverage worldwide. Overall quality of the vaccine was validated by evaluations of allergenicity, antigenicity, and physicochemical parameters. Docking and simulation of molecular dynamics of the multi-epitope with the TLR and HLA receptors demonstrated a possible interaction and stability of the complexes. Furthermore, immune simulation predicted significantly high levels of INF- $\gamma$  and IL-2 and populations of T-helper, T-cytotoxic cells. Although the results suggest that the proposed design is comparable to other *in silico* investigations, *in vitro* evaluations are required.

Keywords: multi-epitope vaccine, immunoinformatics, cutaneous leishmaniasis

# CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

## 1.1 Antecedentes

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida para la cual se ha generado una necesidad imperante de desarrollar estrategias preventivas. Esta engloba a un conjunto de enfermedades causadas por protozoos del género *Leishmania* y transmitidas por la picadura de la mosca de arena hembra de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* [1]. Estos vectores, al alimentarse de la sangre del hospedador inoculan el estadio infeccioso del patógeno, promastigotes, que serán fagocitados principalmente por los macrófagos. En estas células, los promastigotes se transforman en amastigotes, se multiplican por división simple y se extiende la infección a otras células fagocíticas. El vector al ingerir las células infectadas durante su alimentación continúa con el ciclo de infección; las formas amastigotes se convierten en promastigotes dentro del intestino para luego migrar a las células salivales [2,3]. El parásito, la biología del vector y otros factores de riesgo para los humanos relacionados con su estado inmunológico definen si la infección se mantiene en estado asintomático o desarrolla alguna manifestación clínica [4].

Distintas especies de *Leishmania* causan una diversidad de manifestaciones clínicas, que varían en severidad desde lesiones cutáneas autocurativas a enfermedad visceral potencialmente mortal. Aunque la leishmaniasis visceral (LV) esté asociada a una mayor letalidad, la leishmaniasis cutánea (LC) es la forma más común [5]. En América Latina las especies más relevantes son: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* (subgénero *Viannia*); *L. amazonensis* y *L. mexicana* (subgénero *Leishmania*) [6,7]. A diferencia de LC del Viejo Mundo, en la región se producen manifestaciones graves de LC como mucocutánea, cutánea difusa y cutánea diseminada [7].

Las estrategias de vacunación contra la leishmaniasis incluyen la atenuación de parásitos, las vacunas de subunidades basadas en proteínas nativas o recombinantes, y las vacunas de ADN. A pesar del importante avance de estos enfoques aún no hay una vacuna autorizada para humanos [8,9]. Las vacunas diseñadas por métodos convencionales que involucran organismos enteros o proteínas grandes, se ven limitadas debido a la carga antigénica innecesaria y la alta posibilidad de respuestas alérgicas [10]. A principios del siglo XX, en Latinoamérica se realizaron varios ensayos clínicos de Fase I y II, para evaluar

la inmunogenicidad de vacunas basadas en promastigotes muertos. Se observó que la eficacia de estas vacunas está limitada a una baja capacidad de generar inmunidad duradera en los pacientes, y desde el punto de vista económico no son rentables [8,11]. Por otra parte, la vacuna LEISH-F2 [12] basada en una proteína recombinante de tres antígenos y formulada con adyuvante MPL-SE mostró seguridad e inmunogenicidad en los ensayos de Fase II para el tratamiento de LC [8,11]. Aunque estas propuestas son alentadoras aún no se logra una vacuna segura, efectiva, duradera, y de bajo costo, para cualquier forma de leishmaniasis humana [13].

En los últimos años, el uso de epítomos que inducen una respuesta inmune específica, se ha convertido en una estrategia prometedora en el diseño de vacunas contra diferentes microorganismos y protozoarios [14]. El desarrollo de herramientas inmunoinformáticas ha facilitado la identificación de potenciales epítomos a través del análisis de secuencias antigénicas, unión a supertipos de moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC)/ antígenos leucocitarios humanos (HLA) [15-17] y formulaciones que incluyan una combinación de múltiples epítomos y adyuvantes para mejorar el potencial inmunogénico [9, 14].

La aplicación de la inmunoinformática en el diseño de vacunas requiere de la comprensión del desarrollo de la memoria inmune [17]. Se espera que las vacunas basadas en péptidos o múltiples epítomos sean reconocidas y procesadas como ocurre durante el reconocimiento general de patógenos (Figura 1). Las células presentadoras de antígenos (APC) toman muestras de su entorno a través de endocitosis mediada por receptores tipo Toll (TLR) cuando el antígeno o vacuna presenta patrones moleculares asociados a patógenos [18,19].

Dependiendo de las características del antígeno, las APC lo procesará a través de la vía de MHC clase II o la vía MHC-I. Los péptidos antigénicos fagocitados y degradados en los compartimentos endosomales son presentados por moléculas de MHC de clase II. Mientras las moléculas MHC-I, presentan péptidos antigénicos degradados en el citosol por escisión proteosomal y llevados al retículo endoplasmático por el transportador TAP para su unión a la molécula MHC [16,19]. Sin embargo, también hay diferencias clave entre los surcos de unión de las moléculas MHC que determinan la predicción *in silico* de epítomos. MHC-I sólo puede unirse a péptidos cortos (9-11 aminoácidos) mientras que los péptidos unidos a MHC-II varían ampliamente en longitud (9-22 residuos). Los péptidos antigénicos

mostrados por MHC-II son reconocidos por las células T CD4, mientras que las células T CD8 se unen a MHC-I [16]. Las células T CD4 activadas estimulan la producción de anticuerpos por parte de las células B y secretan linfocinas que interactúan con otras células efectoras. Por otra parte, las células T CD8+ presentan actividad citotóxica y producen varias linfocinas [20].

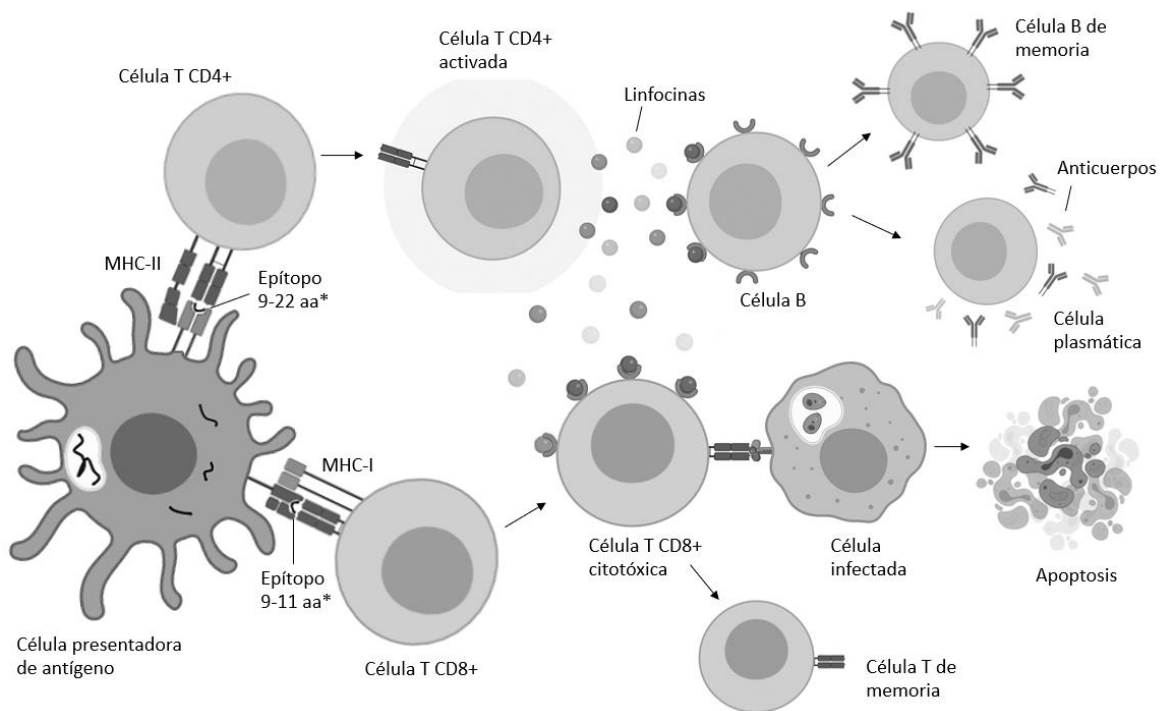


Figura 1. Reconocimiento general del patógeno y descripción de la respuesta inmunitaria. El reconocimiento de una vacuna multi-epítipo a través de los receptor MHC-I estimula el desarrollo de células T citotóxicas (CD8+) que desencadena la producción de linfocinas para atacar células infectadas. Por otra parte, el reconocimiento por MHC-II activa células T colaboradoras (CD4+) que secretan linfocinas que reclutan otras células efectoras. Esquema basado en Kar et al. 2020 [18]. Realizado en Biorender.

Diferentes subconjuntos de células y moléculas median la respuesta inmune contra la infección por *Leishmania*; sobre todo esta defensa se atribuye a la activación y diferenciación de linfocitos T que inducen la activación de fagocitos mononucleares infectados y la eliminación de parásitos por la producción de citocinas [21]. Las principales células inmunitarias innatas que responden a la infección son los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas (DC) que son reclutadas para la eliminación del parásito [22]. Los TLR presentes en estas células son reguladores importantes en la respuesta innata. La señalización TLR está involucrada en la fagocitosis, la maduración, la actividad microbicida y la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias [23].

La respuesta inmune específica comienza con la activación de linfocitos T tras el reconocimiento del antígeno en el MHC/HLA presentado por las DC que son reclutadas en la lesión cutánea [24]. Las células Th1 CD4<sup>+</sup> producen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL2 relacionadas a la inmunoprotección al activar los macrófagos. Adicionalmente, los macrófagos secretan IL-10 que puede desempeñar un rol en el control de la respuesta inflamatoria excesiva [25]. Las células T CD8<sup>+</sup> también producen IFN- $\gamma$  como estimulador de respuesta [26] y la Granzima B se asocia a la eliminación de las células infectadas [27]. Los parásitos mueren por los macrófagos activados, al no ser una respuesta neutralizada por anticuerpos, la respuesta humoral es incapaz de controlar la carga parasitaria [23]. De manera que la activación de las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en la respuesta inmune contra *Leishmania* representa una estrategia interesante como posibles candidatos a una vacuna.

Los epítomos potenciales se pueden identificar a partir de proteínas que se han descrito como antigénicas y como candidatos para vacunas. Hamrouni et al. identificaron *in vitro* potenciales multi-epítomos de las proteínas H2B, PSA y LmlRAB capaces de estimular células T en individuos curados de LC causada por *L. major*. H2B, PSA y LmlRAB indican ser candidatos adecuados debido a que están conservados entre las especies de *Leishmania*, presentes en las etapas amastigote y promastigote y, confieren una protección significativa en modelos animales [28]. Por otra parte, Llanes et al. han diseñado una base de datos de epítomos predichos para *L. (Vianna)sp.*, debido a que se ha informado que varias proteínas entre las especies de los subgéneros *Leishmania* y *Vianna*, muestran una divergencia de secuencia alta [24].

Las propuestas de vacunas contra leishmaniasis formuladas a través de enfoques inmunoinformáticos se han basado en la predicción de epítomos a partir de proteínas secretoras de *L. donovani* [29, 30], proteínas de membrana de *L. major* [31], proteínas de histona, metiltransferasa y antígeno específicas de *L. infantum* [32], y proteomas de *L. braziliensis*, *L. major* y *L. infantum* [33]. Además, en una investigación reciente de Vakili et al. [34] evaluaron con éxito el potencial de la vacuna multi-epítomo diseñada *in silico* al administrarla en ratones con leishmaniasis visceral. Esto sugiere que las vacunas diseñadas *in silico* con epítomos derivados de proteínas de interés, tienen el potencial de progresar hacia fases avanzadas en el desarrollo de vacunas para la leishmaniasis.

El enfoque de diseño de vacunas basado en la selección de epítomos validados y conservados se ha utilizado para enfermedades como mal de Chagas [35], dengue [36],

malaria [37] e influenza [38]. Según lo revisado en literatura, esta estrategia inmunoinformática aún no ha sido explorada para la búsqueda de epítomos contra LC.

## 1.2 Planteamiento del problema

A nivel mundial, 12 millones de personas están infectadas por alguna especie de *Leishmania* y 350 millones están en riesgo de infección [39]. La enfermedad es endémica en 98 países y afecta principalmente a las regiones pobres en África, Asia y América Latina [40]. Además, factores como la desnutrición, el desplazamiento de la población, las viviendas deficientes, el sistema inmunitario débil y la falta de recursos contribuyen al riesgo de esta enfermedad [41,42]. En las últimas décadas, se han reportado cada vez más casos de leishmaniasis en zonas no endémicas relacionado al creciente número de viajeros a países endémicos; observándose casos en Estados Unidos, Canadá y Alemania [43].

Según estimaciones recientes, anualmente se producen 30 000 y más de 1 millón de nuevos casos de leishmaniasis visceral (LV) y cutánea (LC), respectivamente [44]. Pese a que LV sea la manifestación clínica de potencial mortalidad, en América el 75% de los casos corresponden a LC, destacando así la relevancia epidemiológica de esta en el continente [45]. En el Ecuador, la mayoría de casos corresponden a LC con un promedio de 1375 casos anuales en 22 de las 24 provincias del país (en el período del 2015 al 2019); con especial localización en la región amazónica [46].

Las úlceras provocadas por LC provocan lesiones permanentes y desfiguración que conduce al estigma, el aislamiento social y la disminución de la autoestima en los pacientes [47]. Además, LC representa una carga para la economía de las personas afectadas debido al alto costo de tratamiento. Por lo tanto, la leishmaniasis se ha convertido en una enfermedad que además afecta negativamente el estado psicológico y el desarrollo socioeconómico [42,48].

Desafortunadamente, no hay vacunas aprobadas para uso humano contra la leishmaniasis y los medicamentos disponibles para el tratamiento presentan limitaciones respecto a la toxicidad y la creciente resistencia de los parásitos [11,43,49]. Las estrategias empleadas para la prevención se han basado en el control de vectores con uso de insecticidas, control de reservorios animales y manejo ambiental [14]. Sin embargo, estas no han sido suficientes para la disminución de nuevos casos debido a la dificultad de

operación y falta de compromiso de los tomadores de decisiones [50]. Este contexto resalta la necesidad de explorar alternativas que reduzcan el tiempo y el costo de posibles candidatos para el diseño de vacunas.

### 1.3 Justificación de la investigación

El enfoque convencional para el desarrollo de vacunas basado en agentes atenuados o muertos ha presentado una serie de éxitos a lo largo de la historia de la vacunación. Sin embargo, este enfoque está asociado a preocupaciones de seguridad, problemas de producción y un largo tiempo de desarrollo y validación [51,52]. El avance de métodos bioinformáticos en inmunología es una de las estrategias más prometedoras para el diseño de vacunas más eficientes y seguras basándose en la detección de epítomos potenciales [19,21]. Además, el diseño *in silico* representa una alternativa menos costosa y más óptima respecto a los esfuerzos experimentales para identificar posibles candidatos de vacunas [53,54].

Las vacunas de múltiples epítomos basadas en péptidos permiten que la respuesta se centre en epítomos relevantes, evitando aquellos que conducen a respuestas no protectoras o efectos secundarios no deseados como la autoinmunidad o alergenicidad [55,20]. La combinación del mapeo de epítomos y la evaluación experimental posterior permiten la generación de candidatos apropiados para el diseño de vacunas [56].

En los últimos años, se ha avanzado enormemente en el diseño de vacunas contra la leishmaniasis. Se han obtenido resultados alentadores para vacunas de primera y segunda generación en los ensayos clínicos de Fase I y II [31]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, aún no se ha logrado vacunas autorizadas para humanos contra cualquier forma de leishmaniasis. Las vacunas basadas en epítomos son una prometedora estrategia para la protección contra esta enfermedad, ya que se enfocan en generar respuestas específicas, y su diseño permite la combinación de epítomos y adyuvantes para optimizar la respuesta inmune [18].

A pesar de las recientes propuestas de vacunas multi-epítomos y los ensayos en ratones evaluando su capacidad de respuesta inmunológica en LC [29,55], las contribuciones a candidatos aún es una necesidad; pues se necesita de una vacuna profiláctica o terapéutica que interactúe con las principales formas del parásito y que tenga un alcance hacia más de una especie de leishmaniasis. El diseño de candidatos a vacunas *in silico* tiene un gran

potencial debido al conocimiento de antígenos candidatos, acceso público a bases de datos y herramientas inmunoinformáticas.

## 1.4 Objetivos de la investigación

### 1.4.1 Objetivo general

Diseñar una vacuna de múltiples epítomos basada en proteínas antigénicas y epítomos reportados de *Leishmania* a partir de enfoques inmunoinformáticos.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar los epítomos que son altamente conservados entre las especies de *Leishmania* con importancia epidemiológica.
- Evaluar el carácter inmunogénico y cobertura poblacional de los epítomos identificados.
- Construir la secuencia multi-epítomo y evaluar sus propiedades fisicoquímicas, estructuras secundarias y terciarias.
- Simular la inducción de respuesta inmune e interacción con los receptores HLA y TLR de la secuencia multi-epítomo.

## CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

Se ha ilustrado en un diagrama de flujo en la Figura 2, el procedimiento de trabajo de la identificación de epítomos y el diseño de la construcción multi-epítomo contra leishmaniasis.

### 2.1 Selección de epítomos conservados

#### 2.1.1 Colección de epítomos específicos de *Leishmania*

La base de datos de Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) (<https://www.iedb.org/>) se utilizó para recolectar los epítomos verificados experimentalmente para *Leishmania*. Siguiendo los términos de búsqueda: epítomos lineales, *Leishmania* (ID:5658), ensayos de células T, ensayos positivos, hospedador humano y cualquier enfermedad. Los datos de MHC Clase I (CD8+) y II (CD4+) se recopilaron por separado el 10 de agosto del 2020.



### 2.1.2 Recuperación y generación de alineación de secuencias múltiples para antígenos de *Leishmania*

La secuencia completa de los antígenos que contienen la mayor cantidad de epítomos reportados de IEDB se recuperaron del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Para cada antígeno recuperado se realizó un BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) automatizado contra la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes (NR) en el NCBI, con el fin de obtener secuencias de alto puntaje para cada una de las especies de *Leishmania*. Seguido, se generaron alineamientos de secuencia múltiple (MSA) para cada uno de los antígenos utilizando el servidor MUSCLE [57] (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Se utilizó el servidor Sequence Identity And Similarity (SIAS) [58] (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) para conocer el porcentaje de identidad en cada MSA.

### 2.1.3 Análisis de la variabilidad de secuencia y epítomos conservados

Se analizó cada MSA usando el Protein Variability Server (PVS) [59] (<http://imed.med.ucm.es/PVS/>) para obtener regiones conservadas dentro de estas secuencias bajo la métrica de variabilidad de la entropía de Shannon con un umbral de 0.5 [36]. Se enmascaró la variabilidad de la secuencia y solo se seleccionaron los fragmentos con una longitud mayor o igual a 9. Para identificar los epítomos conservados, se solapó manualmente las secuencias de fragmentos conservados y los epítomos colectados. Siguiendo a Waller et al. [55] aquellos epítomos CD8 + y CD4 + con una similaridad de al menos un 50% se consideraron como epítomos conservados y se utilizaron para análisis posteriores.

### 2.1.4. Estimación de la unión de HLA para epítomos conservados

Las afinidades de los epítomos conservados se predijeron usando las herramientas disponibles en IEDB. La afinidad de unión de los epítomos conservados CD8 + se predijeron utilizando la herramienta de predicción IEDB MHCI (<http://tools.iedb.org/mhci/>) con el método predeterminado recomendado por IEDB [60] y el conjunto de referencia de alelos IEDB HLA. Se eligieron los epítomos con un rango percentil menor a uno [61]. De manera similar, la predicción de unión de los epítomos CD4+ se realizó en IEDB MHCII

(<http://tools.iedb.org/mhcii/>) con el conjunto de referencia Humanos-HLA y, bajo el método de predicción recomendado por IEDB [62,63]. Los epítomos con un rango percentil menor a cinco se conservaron para análisis adicionales [61].

## 2.2 Predicción de epítomos de antígenos potenciales altamente conservados en *Leishmania*

### 2.2.1 Colección, generación de MSA y análisis de variabilidad de antígenos

Se ha utilizado como referencia las secuencias utilizadas en el estudio de Hamrouni et al [28]. Las secuencias completas de las proteínas H2B, LmIRAB y PSA derivadas de múltiples especies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*) se recuperaron del NCBI. Se siguió la misma metodología mencionada en la sección anterior para la generación de MSA en MUSCLE y obtención de fragmentos conservados por variabilidad de secuencia en PVS Server. Los fragmentos conservados que tienen una longitud mayor a 9 residuos de aminoácidos se seleccionaron para ejecutar las predicciones de epítomo.

### 2.2.2 Predicción de unión de péptidos a las moléculas de HLA- I y HLA-II

La predicción de los epítomos afines a HLA-I a partir de los fragmentos conservados de los antígenos H2B, LmIRAB y PSA se realizó en la herramienta de predicciones de procesamiento MHC-I del IEDB (<http://tools.iedb.org/processing/>)[64]. Este servidor abarca una combinación de tres enfoques para el procesamiento de estos epítomos: afinidad de unión del MHC de clase I, eficiencia de transporte de TAP y escisión proteasomal. La predicción se configuró para el conjunto de referencias “Humano” y los alelos más frecuentes disponible en el servidor. Además, se siguió el método de predicción recomendado por el IEDB [65-67]. Se usó las puntuaciones totales de las evaluaciones combinadas para la elección de los epítomos; se consideraron sólo las valoraciones positivas [68].

Para la predicción de la unión de los péptidos conservados a las moléculas HLA de clase II se utilizó la herramienta de predicción del IEDB- MHCII, siguiendo el procedimiento utilizado en la sección 2.1.4. Para la elección de los péptidos se consideró aquellos que tenían un valor de rango de percentil menor a 10 y que, además tenían un valor de IC50 <500 nM. Las puntuaciones de salida IC50 están relacionadas a la afinidad de los epítomos,

bajo la consideración de IC50 <50 nM alta afinidad, <500 nM de afinidad intermedia y <5.000 nM de baja afinidad [62,63]. Para la elección, se siguió la consideración IC50 <500 nM, debido a la limitada cantidad disponible de péptidos de alta afinidad.

### 2.2.3 Predicción de respuesta de epítomos: Inmunogenicidad e IFN- $\gamma$

La inmunogenicidad de los epítomos MHC-I seleccionados se obtuvo mediante la herramienta Class I Immunogenicity de IEDB (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>) siguiendo los parámetros configurados por defecto (primer, segundo y C-terminal aminoácidos). Cuanto mayor es la puntuación de inmunogenicidad, mayor es la inmunogenicidad del epítomo [69]. Por otra parte, la respuesta que pueden generar los epítomos de MHC-II por la liberación de IFN- $\gamma$  se predijo en el servidor IFNepitope (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/index.php>) [70]. La predicción se realizó mediante un enfoque híbrido de Motif y SVM. Con un modelo de predicción IFN- $\gamma$  vs no inductor de IFN- $\gamma$ .

## 2.3 Cálculo de cobertura poblacional, toxicidad y conservación por epítomo

El porcentaje de la población que posee al menos un alelo capaz de reconocer un epítomo dentro de un grupo se denomina cobertura de protección de la población (PPC). Los epítomos seleccionados se ingresaron en la herramienta PPC de IEDB (<http://tools.iedb.org/population/>). Se utilizaron los parámetros predeterminados y la cobertura se verificó con los alelos de unión HLA-I y HLA-II disponibles [71]. Para comprobar la conservación de los epítomos en las secuencias de los antígenos provenientes de diferentes especies de *Leishmania*, se utilizó la herramienta de conservación de IEDB (<http://tools.iedb.org/conservancy/>) [72]. Además, la predicción de toxicidad por epítomo se realizó en el servidor ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) [73].

## 2.4 Construcción de secuencia de vacuna multi-epítomo

A partir de la predicción inmunoinformática anterior, se construyó una secuencia de múltiples epítomos usando una combinación de los epítomos afines a HLA-I y HLA-II provenientes de los epítomos conservados y predichos. Los principales criterios utilizados para diseñar la construcción multi-epítomo fueron: i) incluir epítomos inmunogénicos y no tóxicos, ii) incluir la misma cantidad de epítomos conservados y predichos, iii) incluir al

menos un epítopo de cada antígeno analizado, iv) alcanzar la máxima cobertura poblacional posible por el set de epítomos seleccionados, y que v) la construcción final debía ser antigénica.

La unión entre epítomos se realizó con los enlazadores AAY y GPGPG para los epítomos HLA-I y HLA-II, respectivamente [74]. Para mejorar la inmunogenicidad de la vacuna diseñada, se añadió el adyuvante ribosomal 50S proteína L7 / L12 (Locus RL7\_MYCTU) (Acceso: P9WHE3), un agonista del receptor TLR-4, recuperado de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) al terminal N de la secuencia mediante un enlazador EAAAK [74,30]. Se utilizaron los enlazadores AAY, GPGPG y EAAAK debido a que han sido usados ampliamente en el empalmado de vacunas multi-epítomos para diferentes enfermedades virales, bacterianas y parasitarias [75,76,77].

Para el orden de los epítomos en el diseño, se siguió la estructura general de otras investigaciones [29,75,76,77]. Además, se evaluó la antigenicidad de varias propuestas del diseño en diferente orden y se eligió aquella con el puntaje más alto como diseño final. La predicción de la antigenicidad del multi-epítopo se realizó en el servidor ANTIGENpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/index.html>) que utiliza microarrays de antigenicidad de proteínas existentes [78].

## 2.5 Predicción de propiedades de la construcción multi-epítopo

### 2.5.1 Predicción de alergenicidad

Con el fin de predecir la alergenicidad del multi-epítopo se utilizó el servidor AllerTOP v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) basada en la transformación de auto-covarianza cruzada de secuencias de proteínas de igual longitud [79] y AllergenFP v.1.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>) basado en un enfoque de huellas dactilares de descriptores basado en la similitud del coeficiente de Tanimoto [80].

### 2.5.2 Evaluación de parámetros fisicoquímicos

Se evaluaron varios parámetros fisicoquímicos de la vacuna utilizando el servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) [81]. Estos parámetros incluyen: composición de aminoácidos, pI teórico, índice de inestabilidad, vida media *in vitro* e *in vivo*, índice alifático, peso molecular y gran promedio de hidropática (GRAVY).

La posibilidad de autoinmunidad se evaluó en el servidor BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se examinó la homología de secuencia de la vacuna final con proteínas humanas.

### 2.5.3 Simulación inmunológica de vacuna multi-epítipo

Para caracterizar aún más la inmunogenicidad y el perfil de respuesta inmune de la vacuna multi-epítipo, se realizaron simulaciones inmunes *in silico* utilizando el servidor C-ImmSim (<http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php>) [82]. Los parámetros de simulación se establecieron de acuerdo a las simulaciones realizadas por Khan et al. [30] administrando tres inyecciones en intervalos de cuatro semanas. La predicción se realizó con una combinación de alelos HLA frecuentes y asociados con la susceptibilidad de LC en pacientes brasileños [83]: HLA-A\*02:01, HLA-A\*24:02, HLA-B\*35:01, HLA-B\*44:02, HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*07:01.

## 2.6 Predicción de estructura de construcción multi-epítipo

### 2.6.1 Predicción de estructura secundaria

La predicción de la estructura secundaria se realizó en el servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) [84]. Además, se usó el servidor Raptor X Property (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/>) para predecir las propiedades de estructura secundaria de la construcción multiepítipo [85].

### 2.6.2 Predicción, refinamiento y validación de estructura terciaria

La estructura terciaria de la vacuna final de múltiples epítopos se predijo a partir del servidor web RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>) [86]. El modelo 3D obtenido se refinó en un proceso de dos pasos, inicialmente utilizando ModRefiner (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) [87] y luego el servidor GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) [88]. El mejor modelo elegido en base a sus puntajes de calidad se validó a través de los servidores ProSAweb (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) [89] y ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) [90]. Además, la calidad general se determinó mediante el análisis de Ramachandran utilizando el servidor PROCHECK

(<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) [91].

## 2.7 Acoplamiento de multi-epítopo con receptores TLR

Una respuesta inmune apropiada depende de la interacción entre una molécula antigénica y un receptor inmune específico. Para estudiar estas interacciones, se realizó la simulación de acoplamiento entre el multi-epítopo con los receptores TLR2 y TLR4 [92]. Primero se predijeron los bolsillos o las cavidades de unión en los receptores TLR-2 (ID-PDB:2Z7X) y TLR-4 (ID-PDB:4G8A) utilizando el servidor CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?3igg>) [93]. El acoplamiento molecular del multi-epítopo con cada receptor se realizó utilizando el servidor web PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) [94,95]. Seguido, se utilizó el refinamiento y reclasificación de los modelos de acoplamiento molecular en el servidor FireDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/>) [96,97]. De las 10 mejores soluciones obtenidas, se eligió el mejor modelo de acuerdo a las puntuaciones de unión. Estas puntuaciones incluyen energía global, energía de contacto atómico, interacción de Van Der Waals, electrostática parcial y estimaciones de la energía de enlace. El resultado del acoplamiento se visualizó con el software Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

Adicionalmente, se realizó un análisis de dinámica molecular para comprender la estabilidad del acoplamiento predicho a través del servidor iMODS (<http://imods.chaconlab.org/>). iMODS simula la capacidad del complejo en términos de deformabilidad, valor propio (eigenvalues), varianza y covarianza [98].

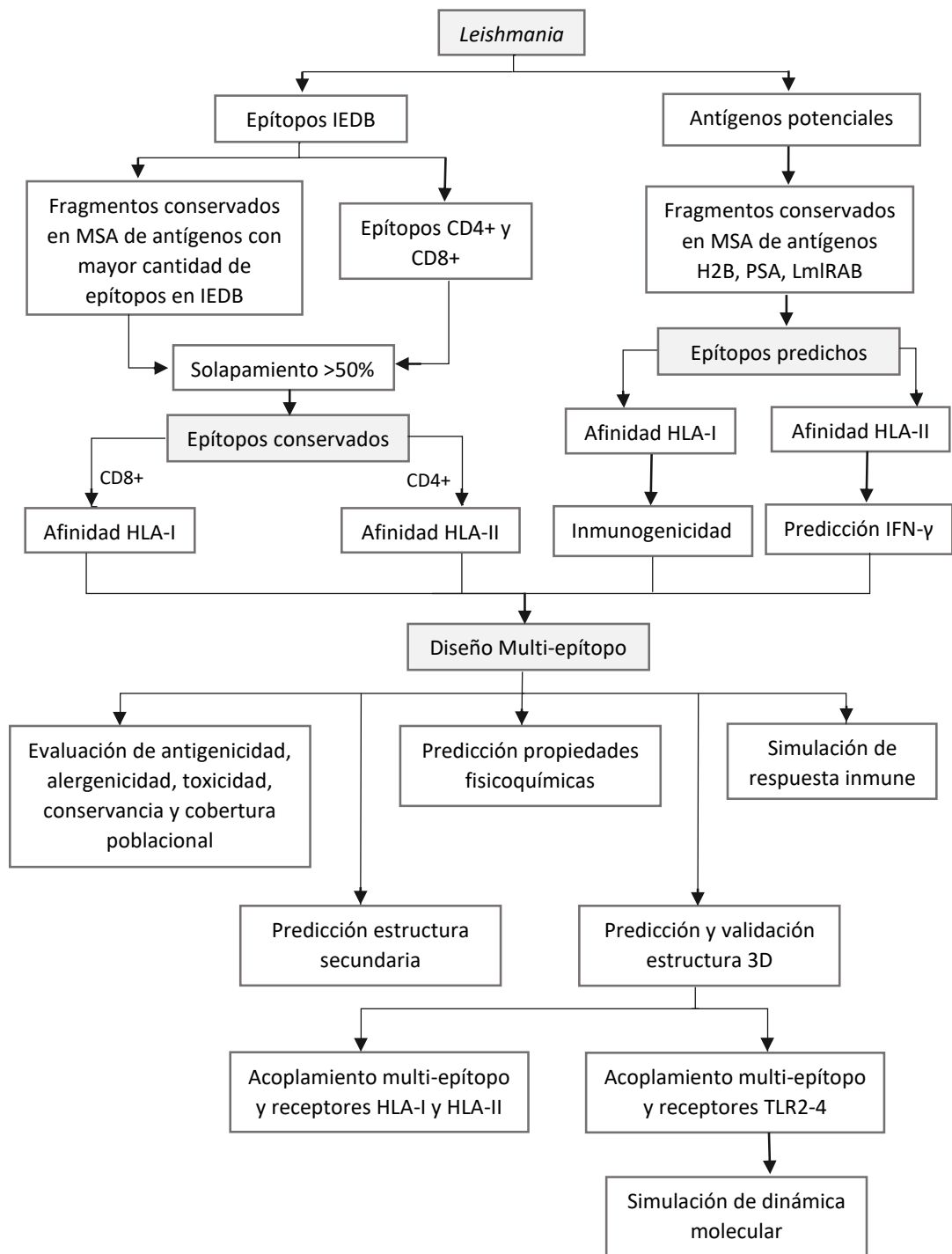


Figura 2. Diagrama de flujo del estudio diseñado. La estrategia inmunoinformática empleada consta de la identificación de los epítomos HLA-I y HLA-II, formulación del diseño multi-epítopo y su evaluación teórica. Por último, la interacción con los receptores TLR4 y HLA-I y HLA-II susceptibles a LC.

## CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

### 3.1 Análisis de epítomos conservados

#### 3.1.1 Identificación de epítomos conservados

La búsqueda de IEDB identificó 121 epítomos lineales de linfocitos T CD4 + y CD8 + confirmados experimentalmente por la infección de *Leishmania*: 66 epítomos MHC clase I y 55 MHC clase II. La mayoría de los epítomos colectados pertenecen a *L. major* y *L. donovani*, conteniendo 37 y 67 epítomos, respectivamente (Anexo 1). Siguiendo a estudios de epítomos conservados en parásitos [61], nos centramos en antígenos para los que se reportaba cuatro o más epítomos y que contaban con un número de acceso recomendado por IEDB. Se seleccionaron 3 antígenos diferentes que contenían un total de 58 epítomos (Figura 3.): KMP-11 (39 epítomos), GP63 (14 epítomos) y 3'NT/UN (5 epítomos).

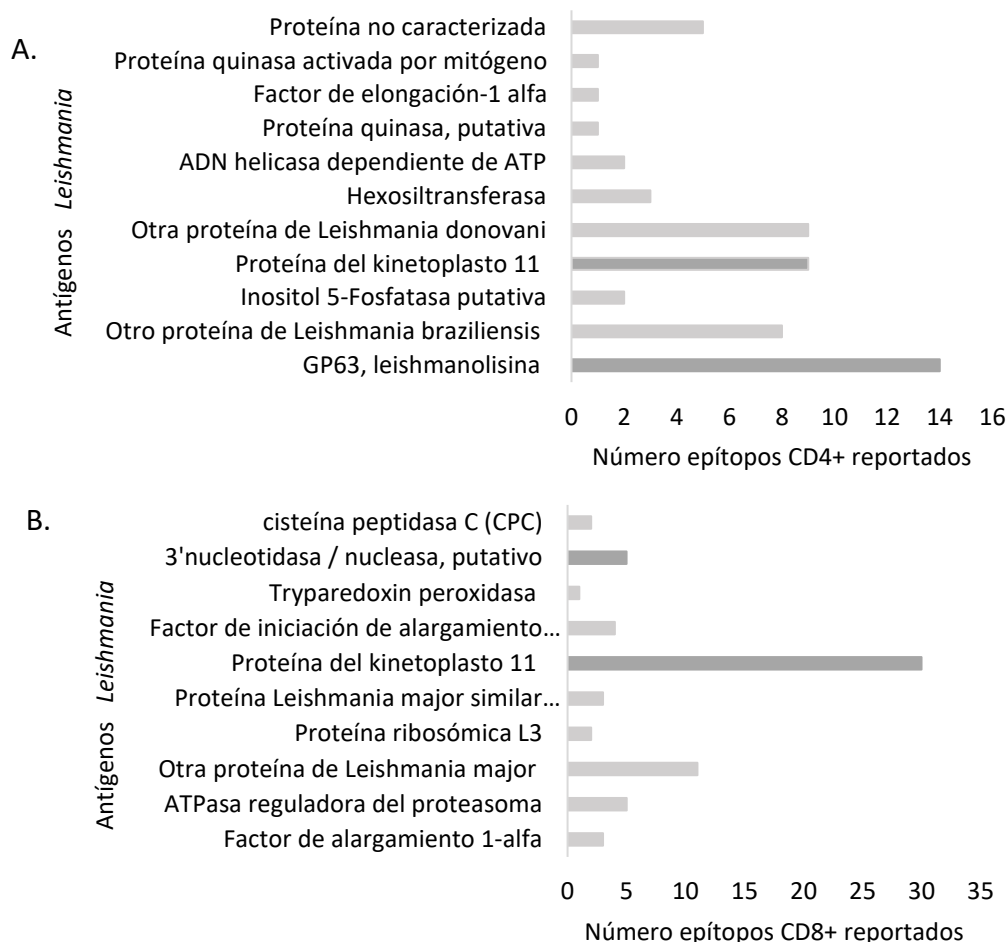


Figura 3. Número de epítomos reportados para antígenos de *Leishmania* en IEDB: (A.) número de epítomos CD4+ y (B.) número de epítomos CD8+ respecto al antígeno que derivan. Se identificó un total de 121 epítomos, en su mayoría pertenecientes a *L. major* y *L. donovani*. En color gris oscuro se destacan aquellos epítomos seleccionados para el análisis.



Con el fin de seleccionar epítomos conservados entre especies de *Leishmania*, se realizó un MSA de las secuencias completas disponibles de KMP-1, GP63 y 3'NT/UN en NCBI (Tabla 1). Las alineaciones mostraron del 94.56 al 100% de identidad para KMP-11; del 71.3 al 98.99% de identidad para GP63 y entre 81.91 al 99.73% de identidad para 3'NT/UN. El análisis de variabilidad por separado de cada MSA, utilizando el servidor PVS, identificó en total 25 fragmentos conservados de nueve o más residuos (Anexo 2). El solapamiento de estos fragmentos con los epítomos experimentales fue de base para la selección de epítomos conservados. Identificando así: 11 epítomos CD4+  $\geq$  15-mers y 14 epítomos CD8+ de 9-mers. Ningún epítomo conservado se observó para el antígeno 3'NT/UN. Además, se observó que, para los 2 epítomos de mayor longitud, se solaparon con 2 fragmentos conservados (Tabla 2).

Tabla 1. Proteínas de *Leishmania* utilizadas como antígenos candidatos para el cribado de epítomos. La selección de estos antígenos se basó en el registro de epítomos en IEDB y búsqueda BLAST de proteínas homólogas en especies de *Leishmania*.

Abreviaciones	Nombre de antígenos	Especies de <i>Leishmania</i>	Número de acceso	Número de AA
GP63	GP63, leishmanolisina	<i>L. major</i>	XP_001681376.1	602
		<i>L. donovani</i>	AYU76665.1	599
		<i>L. infantum</i>	XP_003392249.1	599
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001562828.1	589
		<i>L. mexicana</i>	XP_003872886.1	602
		<i>L. chagasi</i>	AAA53687.1	599
KMP-11	Proteína del kinetoplasto 11	<i>L. panamensis</i>	AIO01832.1	92
		<i>L. amazonensis</i>	AAG32958.1	92
		<i>L. infantum</i>	XP_001469032.1	92
		<i>L. donovani</i>	XP_003864805.1	92
		<i>L. major</i>	XP_003722615.1	92
		<i>L. tropica</i>	O21436.1	92
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001568323.1	92
		<i>L. mexicana</i>	XP_003879219.1	92
		<i>L. guayanensis</i>	AAB94113.1	92
3'NT/UN	3'nucleotidasa / nucleasa	<i>L. donovani</i>	AYU76951.1	381
		<i>L. infantum</i>	XP_003392279.1	381
		<i>L. major</i>	XP_001681645.1	381
		<i>L. mexicana</i>	XP_003873144.1	381
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001563092.2	376
		<i>L. panamensis</i>	XP_010697022.1	368
		<i>L. guayanensis</i>	CCM13752.1	368

Tabla 2. Epítomos conservados obtenidos por la superposición de los epítomos colectados respecto a los fragmentos conservados. Los fragmentos en negro de los epítomos CD4+ (°) y CD8 (\*) son los que coinciden en identidad con los fragmentos conservados (azul) obtenidos por el análisis de variabilidad de MSA de antígenos.

Antígeno	Posición	Fragmento conservado
GP63	303-314	INSSTAVAKAREQYGC*
		TAVAKAREQYGC
	480-489	PFNVFSDAARCIDGAF*
		FNVFSDAARC
KMP-11	10-20	MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDDES*
		MATTYEEFAKLDRLDEEFN*
		KLDRLDEEF °
		AKLDRLDEE °
		LDRLDEEFN °
		AKLDRLDEEFN
	22-59	AKFFADKPDDESTLSPEMREHYEKFERMIKEHTEKFNKK*
		DEEFNKKMQEQNAKFFADKP*
		EHYDKFERMIKEHTEKFNKK*
		FADKPDDESTLSPEMKEHYDK*
MQEQNAKFF °                      ADKPDDESTL °		
KMQEQNAKF °                      KFERMIKEH °		
AKFFADKPD °                      FERMIKEHT °		
	KMQEQNAKFFADKPDDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHT	
61-74	IKEHTEKFNKKMHEHSEHFQKFAELLEQQKAAQYPSK*	
	KFNKKMHEHSEHFKHKFAEL*	
	FNKKMHEHS°	
	KFNKKMHEHSEHFK	
	FKHKFAELLEQQKAAQYPSK*	
	LEQQKAAQY °	
	KFAELLEQQ °	
EQQKAAQYP °		
AELLEQQKA °		
	KFAELLEQQKAAQYP	

### 3.1.2 Afinidad de unión de epítomos conservados a HLA-I

Todos los epítomos conservados CD8+ tenían una longitud de 9 residuos, lo cual es el tamaño favorable para que ocurra una unión a moléculas de HLA-I. A partir de la herramienta IEDB-MHCI se predijo los perfiles de unión de epítomos a alelos HLA humanos. Sólo se analizaron los epítomos con un rango percentil menor a uno, debido a que puntuaciones bajas de este parámetro son consideradas como mejores predicciones de afinidad por al menos uno de los HLA-I analizados [99]. Además, para análisis posteriores se descartaron los epítomos que no mostraron ninguna afinidad. Reduciéndose así el conjunto de epítomos conservados CD8+ de 14 a 5 (Tabla 3). Siendo todos estos epítomos pertenecientes al antígeno KMP-11.

Tabla 3. Afinidad de unión a HLA-I para epítomos conservados de T CD8+ de *Leishmania*. Se identificaron 5 epítomos del antígeno KMP-11 de 9 residuos de longitud afines a HLA.

Epítomo	Antígeno	Afinidad de unión a HLA-I	Rango percentil
KMQEQNAKF	KMP-11	HLA-A*32:01	0.03
		HLA-A*23:01	0.31
		HLA-B*58:01	0.35
		HLA-A*24:02	0.37
		HLA-A*30:02	0.48
		HLA-B*57:01	0.41
		HLA-B*15:01	0.04
LEQQKAAQY	KMP-11	HLA-B*44:02	0.05
		HLA-B*15:01	0.74
		HLA-A*30:02	0.92
		HLA-B*44:03	0.06
AELLEQQKA	KMP-11	HLA-B*44:03	0.41
		HLA-B*40:01	0.78
		HLA-B*44:02	0.46
KLDRLDDEEF	KMP-11	HLA-A*32:01	0.48
MQEQNAKFF	KMP-11	HLA-B*15:01	0.42

### 3.1.3 Afinidad de unión de epítomos conservados a HLA-II y capacidad de inducción de IFN- $\gamma$

Los 11 epítomos identificados como conservados de CD4 + contenían entre 15 a 38 aminoácidos. Usando la herramienta del IEDB- MHCII se predijo los perfiles de unión a HLA de todos estos epítomos, y se seleccionaron para posteriores análisis aquellos con un rango percentil menor a cinco. El output de este análisis fueron 28 fragmentos de epítomos, esto se debe a que el cálculo de unión se da para una longitud de 15 aminoácidos. Obteniéndose varios fragmentos de análisis para los epítomos más grandes.

Se identificaron manualmente a que secuencias de los epítomos pertenecían los fragmentos seleccionados. Además, se evaluó la capacidad de estos epítomos derivados de epítomos conservados de longitud larga para inducir una respuesta inmune. Esta última predicción se realizó debido a que son epítomos diferentes en longitud a los experimentales y se desconocería si mantienen una posible respuesta inmune. Se demostró que 18 epítomos tenían capacidad de inducción de IFN- $\gamma$  a partir de su puntuación positiva calculada en el servidor IFNepitope (Tabla 4).

Tabla 4. Afinidad de unión a HLA II y puntuación de IFN- $\gamma$  de epítomos conservados de T CD4 + de *Leishmania*. Se demostró que 18 epítomos derivados de los antígenos KMP-11 y GP63 mostraron afinidad y una posible capacidad de inducción de IFN- $\gamma$ .

Epítomo	Antígeno	Afinidad de unión a HLA-II	Rango Percentil	IFN- $\gamma$
IKEHTEKFNKMMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQYPSK				
SEHFKQKFAELLEQQ	KMP-11	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	1.3	0.013511
		HLA-DRB1*09:01	2.9	
		HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	3.7	
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	4	
EHSEHFKQKFAELLE	KMP-11	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	1.9	0.093795
		HLA-DRB1*09:01	3	
		HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	4	
EHFQKQKFAELLEQQK	KMP-11	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	2.1	0.155702
		HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	3.8	
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	4.5	
FKQKFAELLEQQKAA	KMP-11	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	4	0.304155
FKHKFAELLEQQKAA	KMP-11	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	4.2	1
HFKQKFAELLEQQKA	KMP-11	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	3	0.369048
AKFFADKPDESTLSPEMREHYEKFERMIMKEHTEKFNKK				
EHYEKFERMIMKEHTE	KMP-11	HLA-DRB1*11:01	1.3	0.128000
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	3.4	
YEKFERMIMKEHTEKF	KMP-11	HLA-DRB1*11:01	1.3	0.354698
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	4.8	
EKFERMIMKEHTEKFN	KMP-11	HLA-DRB1*11:01	1.3	0.395087
REHYEKFERMIMKEHT	KMP-11	HLA-DRB1*11:01	1.3	0.065987
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	2.8	
EHYDKFERMIMKEHTEKFNKK				
EHYDKFERMIMKEHTE	KMP-11	HLA-DRB1*11:01	1.3	0.085320
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	4.4	
YDKFERMIMKEHTEKF	KMP-11	HLA-DRB1*11:01	1.3	0.151545
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	4.8	
DKFERMIMKEHTEKFN	KMP-11	HLA-DRB1*11:01	1.3	0.200151
INSSTAVAKAREQYGC				
INSSTAVAKAREQYG	GP63	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	1.7	2
NSSTAVAKAREQYGC	GP63	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	4.5	3
MATTYEEFAAKLDRLDEEFN				
YEEFAAKLDRLDEEF	KMP-11	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	4.6	0.101031

## 3.2 Análisis de antígenos candidatos para la predicción de epítomos

### 3.2.1 Alineación de secuencias e identificación de regiones conservadas

Basándose en el alineamiento de las secuencias utilizadas por Hamrouni et al. [28] se realizó el análisis de variabilidad para obtener fragmentos conservados (Tabla 5). Las alineaciones analizadas por SIAS mostraron que la identidad de las secuencias se encontraba entre 79.27 al 100% para H2B, entre 63.6 al 99.34% de para LmlRAB y del 51.68 al 83.67% para PSA. Se obtuvo 13 fragmentos conservados de longitud  $\geq 9$  residuos de aminoácidos; perteneciendo 7 fragmentos al antígeno LmlRAB (Anexo 3).

Tabla 5. Proteínas de *Leishmania* utilizadas como antígenos candidatos para la predicción de epítomos. Se utilizaron como referencia, las secuencias empleadas en el estudio de Hamrouni et al. [9].

Abreviaciones	Antígeno	Especies <i>Leishmania</i>	Número de Acceso	Número de AA
H2B	Histona H2B	<i>L. major</i>	AAK21263.1	111
		<i>L. donovani</i>	XP_003858819.1	111
		<i>L. infantum</i>	XP_001463598.1	111
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001564132.1	111
		<i>L. mexicana</i>	XP_003874182.1	107
		<i>L. panamensis</i>	XP_010704371.1	111
		<i>L. guyanensis</i>	CCM14552.1	111
PSA	Antígeno de superficie del promastigote	<i>L. amazonensis</i>	ACY70940.1	371
		<i>L. infantum</i>	ACY70941.1	463
		<i>L. donovani</i>	AA96325.1	386
		<i>L. major</i>	AAB38549	385
		<i>L. tropica</i>	AAF80491	626
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001563125	912
		<i>L. mexicana</i>	XP_003873184	367
		<i>L. chagasi</i>	AAB62271	417
LmlRAB	Leishmania (L.) major large RAB GTPase	<i>L. major</i>	AAX63742.1	610
		<i>L. donovani</i>	XP_003863179	609
		<i>L. infantum</i>	XP_001467349	609
		<i>L. braziliensis</i>	XP_001567099.1	609
		<i>L. mexicana</i>	XP_003877608.1	610
		<i>L. panamensis</i>	XP_010701471.1	609
		<i>L. guyanensis</i>	CCM17851.1	609

### 3.2.2 Predicción e identificación de epítomos HLA-I y epítomos HLA-II

A partir de la predicción de procesamiento de epítomos y afinidad a HLA-I bajo la

consideración de una puntuación total positiva, se obtuvo 6 epítomos con afinidad a varios alelos HLA-I. Además, se predijo que 5 de estos epítomos presentaban inmunogenicidad (Tabla 6). Mientras que para la unión a HLA-II se predijeron 9 epítomos con una longitud de 15-mer, con valores de rango de percentil menor a 10 y valores de IC50 <500 nM, considerados de afinidad intermedia. Se siguió esta consideración debido a la limitada cantidad disponible de péptidos de alta afinidad (IC50<50nM). De los epítomos seleccionados, 7 se identificaron por su capacidad de inducción de IFN- $\gamma$  usando el servidor de IFNepitope (Tabla 7).

Tabla 6. Afinidad de unión a HLA I, puntuación total y puntuación de inmunogenicidad de epítomos predichos de *Leishmania*.

Epítomo	Antígeno	Alelo HLA-I	Proteasome Score	TAP Score	MHC Score	Processing Score	Total Score	Inmunogenicidad
AMAEGTKAV	H2B	HLA-A*02:01	1.14	0.25	-1.37	1.39	0.02	0.02385
		HLA-A*02:06	1.14	0.25	-1.39	1.39	0	
GASVRLQIW	LmIRAB	HLA-B*57:01	1.48	0.26	-1.94	1.74	0.02	0.0078
		HLA-B*58:01	1.48	0.26	-1.58	1.74	0.16	
VTPTVGTDFY	LmIRAB	HLA-A*01:01	1.41	1.28	-2.05	2.68	0.64	0.23232
		HLA-B*35:01	1.41	1.28	-2.46	2.68	0.22	
TPTVGTDFY	LmIRAB	HLA-B*35:01	1.41	1.13	-1.21	2.54	1.33	0.2108
		HLA-B*53:01	1.41	1.13	-2.52	2.54	0.01	
LQIWDTAGL	LmIRAB	HLA-A*02:06	1.3	0.54	-1.29	1.84	0.54	0.37705
CTSSAPVAR	PSA	HLA-A*68:01	1.27	0.64	-1.08	1.91	0.83	-0.13481

Tabla 7. Afinidad de unión a HLA II, puntuación total y puntuación de inmunogenicidad de epítomos predichos de *Leishmania*.

Epítomo	Antígeno	Afinidad de unión HLA-II	Rango percentil	SMM align IC50(nM)	Inducción IFN- $\gamma$
AELAKHAMAEGTKAV	H2B	HLA-DQA1*05:01/ DQB1*03:01	7	77	0.12604887
ASVRLQIWDTAGLEK	LmIRAB	HLA-DRB4*01:01	10	340	1
ELAKHAMAEGTKAVS	H2B	HLA-DQA1*05:01/ DQB1*03:01	6	59	-0.06593900
GASVRLQIWDTAGLE	LmIRAB	HLA-DRB4*01:01	6.7	251	0.29599426
PGASVRLQIWDTAGL	LmIRAB	HLA-DRB4*01:01	6.6	249	0.096391191
VPGASVRLQIWDTAG	LmIRAB	HLA-DRB4*01:01	5.3	211	-0.20143795
		HLA-DRB4*01:01	5.2	208	
		HLA-DQA1*01:02/ DQB1*06:02	8.9	372	

(continúa)

(continuación)

Epítopo	Antígeno	Afinidad de unión HLA-II	Rango percentil	SMM align IC50(nM)	Inducción IFN-γ
VALLCTSSAPVARA	PSA	HLA-DRB1*13:02	2.5	86	1
		HLA-DRB3*02:02	2.5	-	
		HLA-DRB1*04:01	4.4	144	
		HLA-DPA1*02:01/ DPB1*14:01	6.1	-	
		HLA-DRB1*09:01	7.2	226	
		HLA-DRB1*07:01	8.3	21	
		HLA-DQA1*05:01/ DQB1*03:01	8.5	59	
		HLA-DRB1*01:01	9.9	51	
SVRLQIWDTAGLEKY	LmIRAB	HLA- DQA1*01:01/DQB1*05:01	8.3	178	0.55818736
VLPAELAKHAMAEGT	H2B	HLA- DQA1*04:01/DQB1*04:02	9.8	136	0.29909564

### 3.3 Cálculo de cobertura poblacional, toxicidad y conservación por epítopo

La cobertura poblacional máxima alcanzada por un solo epítopo HLA-I fue del 42.60% a nivel mundial y 21.85% para Sudamérica (Anexo 4). Mientras que un epítopo HLA-II, el PPC más alto fue de 48.09% a nivel mundial y 25.76% en Sudamérica (Anexo 5). El cálculo no fue posible para los haplotipos HLA-DQA1/DQB1 y HLA-DRB4\*01:01 debido a que no se encontraban disponibles en la herramienta IEDB-Population Coverage. Sin embargo, para comprender la distribución y frecuencia de estos haplotipos se realizó una búsqueda en la base de datos de Allele Frequency Net (<http://allelefreqencies.net/>). Seis de los haplotipos mostraron distribución en varias poblaciones a nivel mundial. Mientras que cuatro de los haplotipos se distribuían en América, Asia del Sur y Norte de África (Anexo 6).

En términos de conservación, entre todas las secuencias seleccionadas de diferentes especies de *Leishmania* para el alineamiento, todos los epítomos se conservaron en más del 86.67% y no presentaron toxicidad (Anexos 4-5).

### 3.4 Construcción de secuencia de vacuna multi-epítopo

Se probaron varios sets considerando los criterios mencionados en la sección 2.4 (Anexo 7). La combinación elegida contenía 16 epítomos (7 afines a HLA-I y 9 afines HLA-II) y alcanzó una cobertura de población mundial del 93.61%. También se realizó este cálculo para Sudamérica 73.9%, Sur de Asia 83.72% y Norte de África 89.83%, donde la

leishmaniasis es endémica y se reportan la mayor cantidad de casos de esta enfermedad [41].

De los epítomos conservados, se eligieron 3 epítomos CD8+ y 5 epítomos CD4+; la mayoría de estos derivados de los antígenos KMP-11 (6 epítomos) y 2 CD4+ de GP63. Los epítomos predichos seleccionados se derivaron principalmente del antígeno LmIRAB (4 epítomos), 2 epítomos H2B y un único de PSA.

Los 16 epítomos seleccionados se fusionaron con los enlazadores AAY y GPGPG para formar la construcción de multi-epítomo. Con el fin de potenciar las respuestas inmunitarias se agregó como adyuvante el agonista de TLR4, 50S ribosómico L7/L12 con la ayuda del enlazador EAAAK. La construcción final de la vacuna propuesta contenía 397 residuos de aminoácidos como se representa en la figura 4. El orden de los epítomos se definió por el valor más alto de antigenicidad obtenido al evaluar diferentes propuestas; siendo el valor de 0.895206 predicho por el servidor ANTIGENpro para el diseño final.

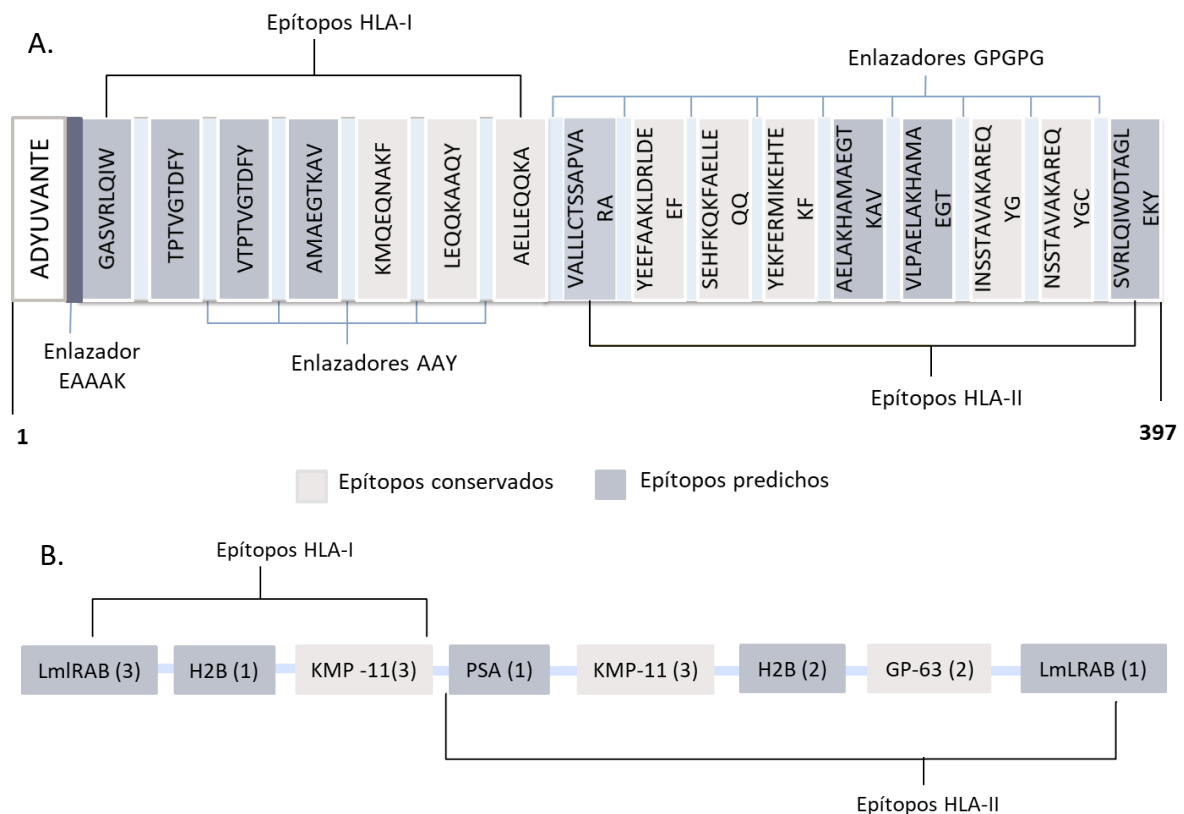


Figura 4. Diagrama del diseño multi-epítomo. La secuencia multi-epítomo consta de 397 residuos de aminoácidos. A. El adyuvante y el epítomo del extremo N se han unido mediante el enlazador EAAAK. Mientras que, se usaron enlazadores AAY y GPGPG para unir los epítomos HLA-I y HLA-II, respectivamente. B. Ubicación de epítomos de acuerdo a los antígenos de los que derivan. En paréntesis se indica el número de epítomos por antígeno.



### 3.5 Evaluación de vacuna multi-epítopo

#### 3.5.1 Evaluación de parámetros fisicoquímicos

La predicción en los servidores AllerTOP y AllergenFP indicaron que la construcción probablemente no sea alergénica con adyuvante como sin adyuvante. Por otra parte, se predijeron varios parámetros químicos y físicos asociados con el multi-epítopo utilizando ExPASy. El peso molecular se calculó de 41.2 kDa y 5.05 del valor de  $pI$  teórico. El número total de residuos de aminoácidos cargados positiva y negativamente fue 54 y 41, respectivamente. La vida media estimada en reticulocitos de mamíferos fue de 30 horas, *in vitro*; mientras que *in vivo* fue de 20 horas en levadura y 10 horas en *E. coli*. El índice de inestabilidad se calculó en 25.05 y el índice alifático de 74.23. El valor GRAVY de las construcciones de vacuna se calculó como -0,215. Además, no se encontró homología con ninguna proteína humana (Anexo 8).

#### 3.5.2 Simulación inmunológica de vacuna multi-epítopo

El perfil inmunogénico obtenido por el servidor C-IMMSIM indica que las respuestas secundarias y terciarias generadas fueron más altas en comparación con la respuesta primaria. La respuesta primaria se caracterizó por altos niveles de IgM mientras que las respuestas secundarias y terciarias por aumentos en los niveles de anticuerpos IgG1 + IgG2, IgM e IgG + IgM con una disminución en la concentración de antígeno (Figura 5. A). Además, se observó el aumento en las poblaciones de células B, las células TH (colaboradoras) y TC (citotóxicas) lo que sugiere el desarrollo de la memoria inmunitaria (Figura 5. B-D). La generación de una adecuada respuesta inmune fue apoyada por los altos niveles de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 y TGF- $\beta$  observados en la simulación (Figura 5. E).

### 3.6 Predicción de estructura de construcción multi-epítopo

#### 3.6.1 Predicción de estructura secundaria

Se predijo que la vacuna final contenía 54.66% de hélice  $\alpha$ , 9.82% de lámina  $\beta$  y 35.52% de estructuras al azar (Anexo 9). Cerca del 70% de la estructura secundaria se predijo con un alto nivel de confianza por el servidor de propiedades PSI-PRED. Con respecto a la accesibilidad de los residuos de aminoácidos a los disolventes, RaptorX Property predijo que el 58% quedaría expuesto, el 20% mostraría una exposición media y el 20% quedaría cubierto. Además, se predijo que el 9% del total de los residuos estaban ubicados en dominios desordenados.

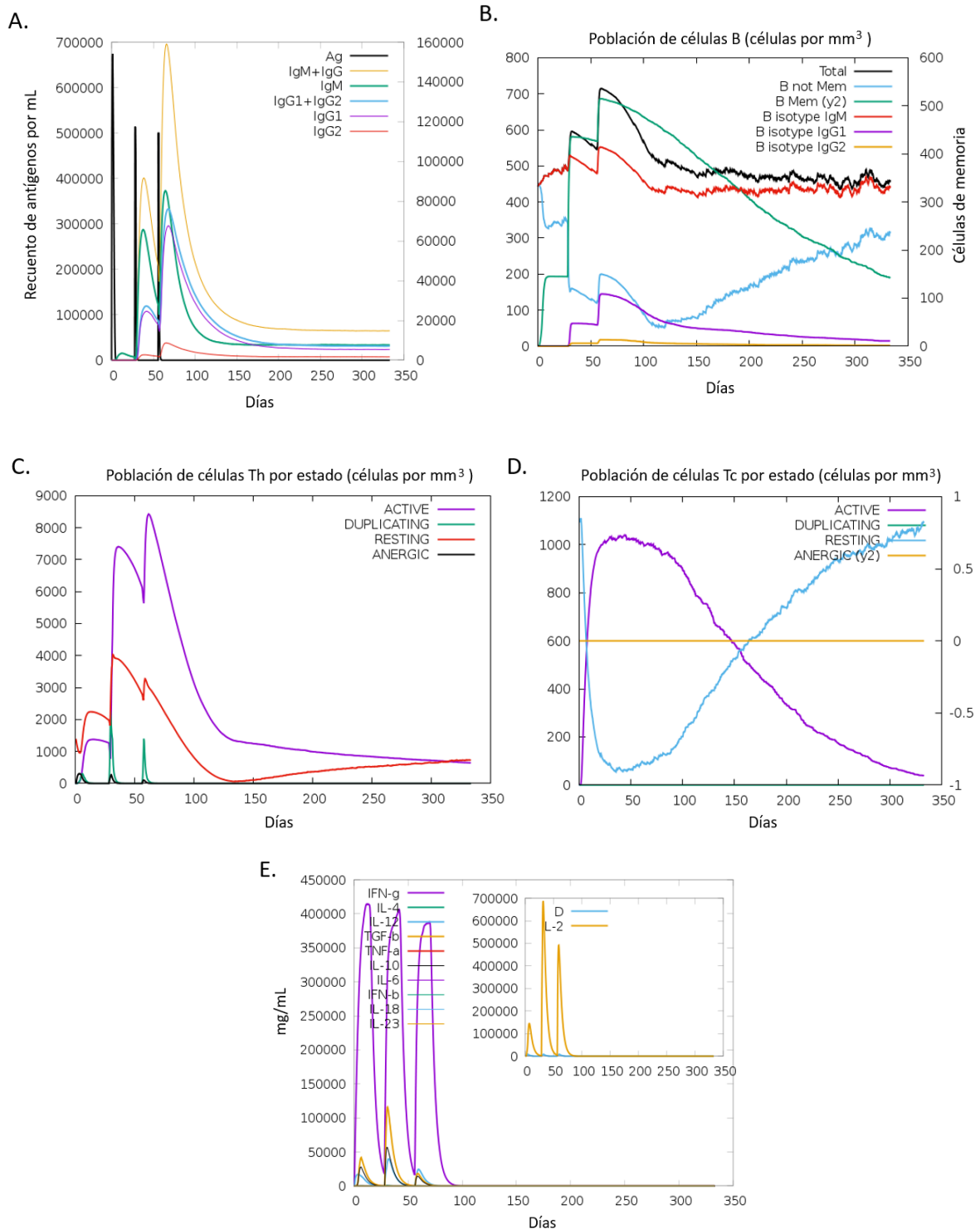


Figura 5. Simulación inmunológica *in silico* del péptido multi-epítipo por tres inyecciones administradas. (A) Producción de inmunoglobulina en respuesta a inyecciones de antígeno (líneas negras), (B) Evolución de las poblaciones de células B después de las tres inyecciones. (C) Evolución de las poblaciones de células T cooperadoras y (D) T-citotóxicas por estado después de las inyecciones, (E) Perfil de producción de citocinas.

### 3.6.2 Predicción, refinamiento y validación de estructura terciaria

La estructura terciaria de la vacuna multiepítopo obtenida por RaptorX predijo que los datos de entrada tienen dos dominios. Se utilizó 1dd3A como la mejor plantilla para modelar. La calidad de la estructura modelada se evaluó por el valor P, este fue  $4,20 \times 10^{-5}$ . Se modeló el 100% de los aminoácidos y se encontró un 15% de desorden en el modelo. Seguido al refinamiento en ModRefiner, se produjo cinco modelos refinados en GalaxyRefiner. Según los puntajes de calidad para todos los modelos refinados (Anexo 10), se encontró que el modelo 4 (Figura 6. A) era el más adecuado en varios parámetros, incluidos GDT-HA (0.9597), RMSD (0.400) y MolProbity (1.565). Además, la puntuación de choque fue 6.5, la puntuación de los rotámeros deficientes fue de 0.7 y la puntuación de la parcela de Ramachandran fue del 96.7%. El análisis del diagrama de Ramachandran (Figura 6. B) del modelo seleccionado reveló que el 95.1% de los residuos se encuentran en regiones favorecidas, el 4.3% de los residuos estarían en las regiones permitidas y el 0.6% en la región no permitida. ProSA-web y ERRAT verificaron aún más la calidad del modelo 3D. Se obtuvo una puntuación Z de -7.52 en ProSA-web (Figura 6. C). Mientras que ERRAT indicó un factor de calidad del 92.99% (Figura 6. D).

### 3.7 Acoplamiento de multi-epítopo con el receptor TLR-4

Se realizó el acoplamiento molecular para evaluar la interacción entre el modelo refinado y el receptor inmune en PatchDock. La salida de este acoplamiento proporcionó varios resultados, de los cuales se analizaron los 10 mejores resultados por el refinamiento en FireDock (Anexo 11-12). El mejor complejo acoplado se eligió en función de su energía global de -10.03 kcal/mol con el receptor TLR2 y -8.84 kcal/mol con TLR4, siendo los valores más bajos de las soluciones obtenidas (Figura 7 A-B). Por otra parte, la energía global del acoplamiento con los receptores HLA-I y HLA-II fue de -6.59 kcal/mol y -0.44 kcal/mol respectivamente (Figura 7. C-D).

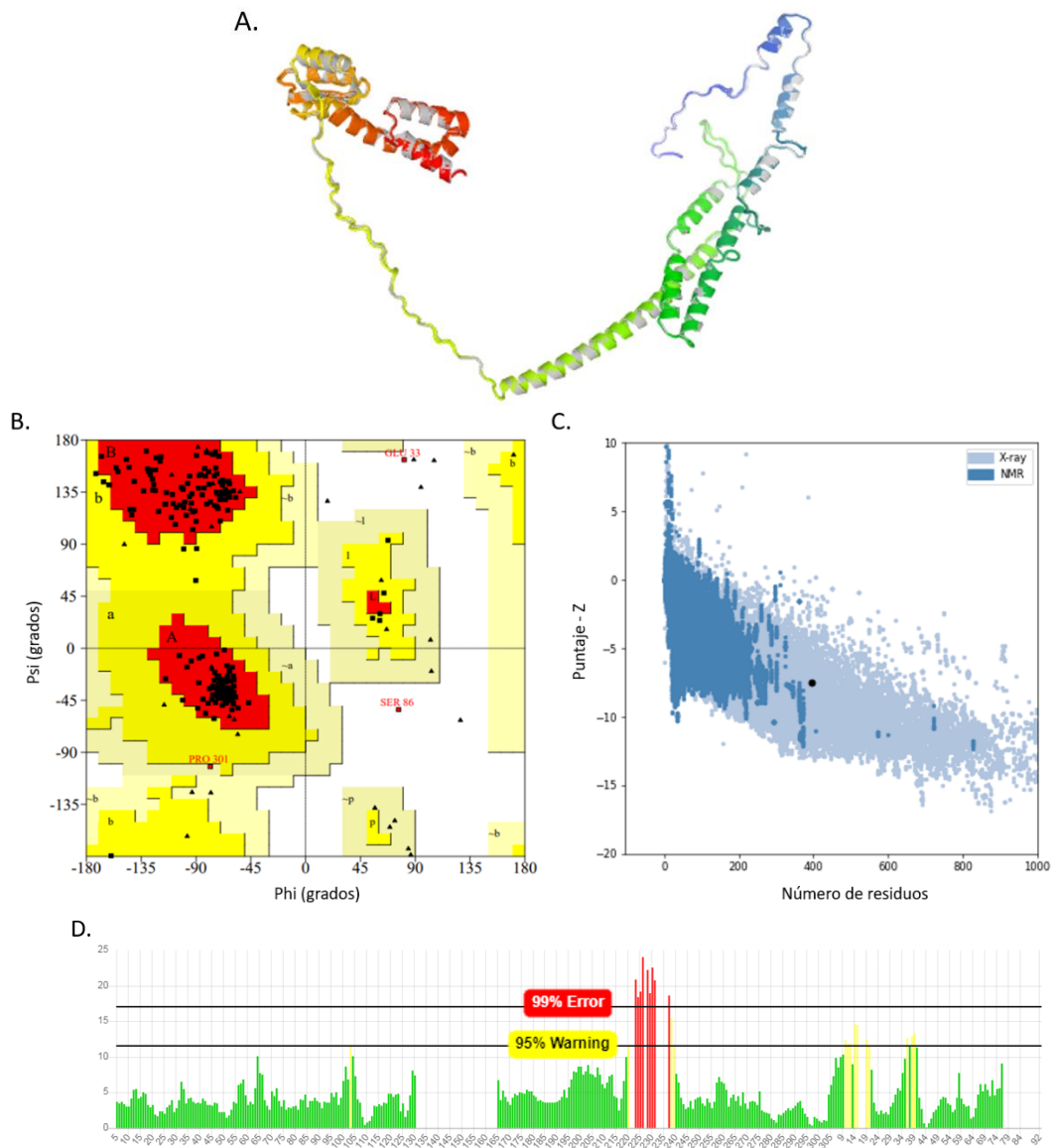


Figura 6. Estructura y validación de la vacuna multi-epítipo. (A) Modelo 3D final de la vacuna obtenida después del modelado y refinamiento (coloreado) sobre modelo crudo (gris). (B) Gráfica Ramachandran de la estructura refinada, 95.1% de los residuos están la región favorecida. (C) Validación PROSAWEB que muestra la puntuación Z (-7.52) y (D) Valores de ERRAT y factor de calidad del 92.99%

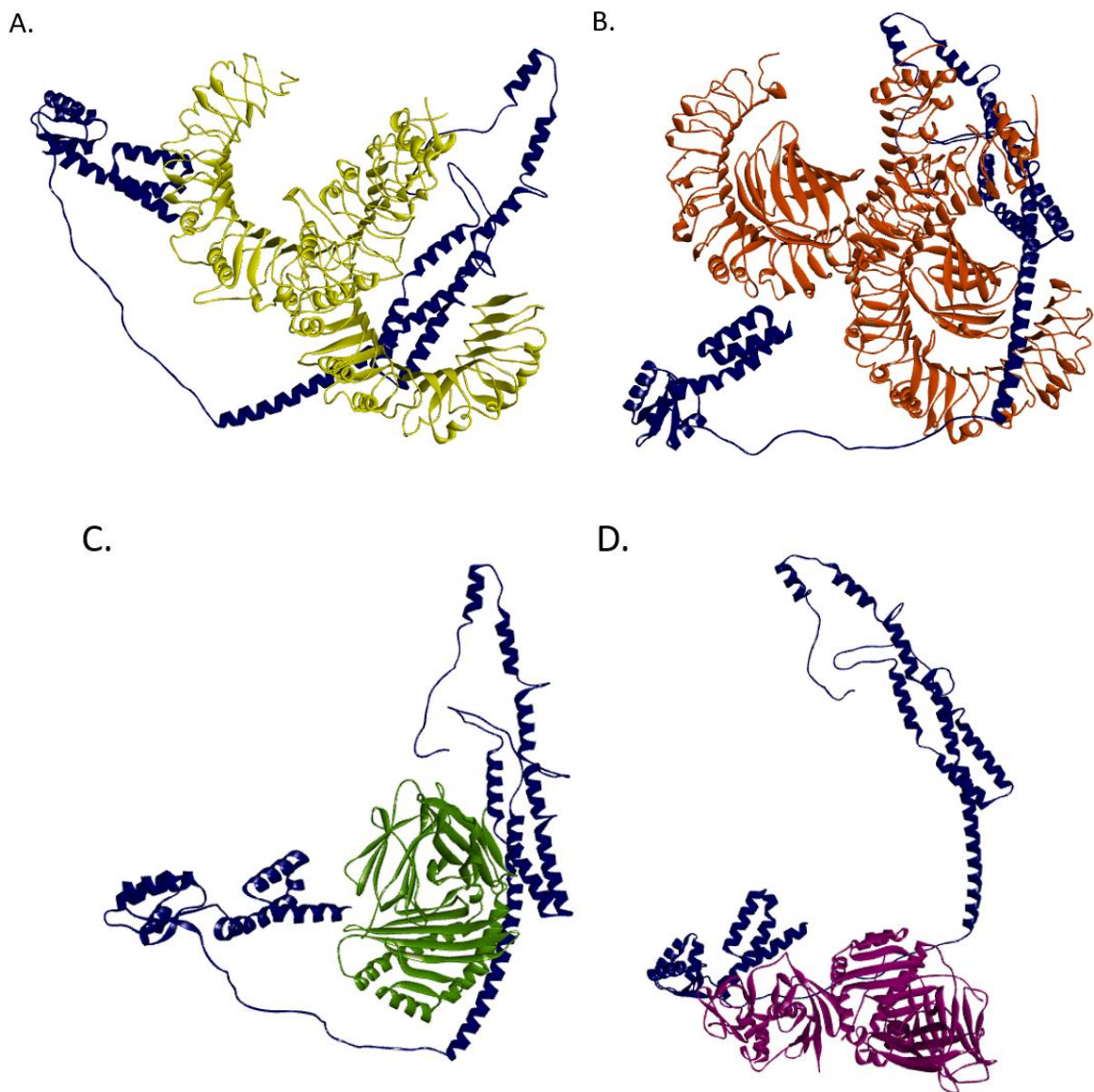


Figura 7. Interacción molecular de la vacuna candidata con los receptores: (A) TLR2 mostrado en color amarillo, (B) TLR-4 en color naranja, (C) HLA-I mostrado en verde y (D) HLA-II en morado. Se visualiza la mejor solución del acoplamiento en función de su energía global, generado por PatchDock-FireDock.

### 3.8 Simulación de dinámica molecular

Se evaluó la estabilidad del acoplado del complejo multiepítipo-TLR mediante el análisis en modo normal (NMA) en I-Mod. Los picos en el gráfico de deformabilidad del complejo indica las regiones con posible deformabilidad, encontrándose en gran parte por debajo de 0.8 con el complejo a TLR2 (Figura 8A) y 0.6 con TLR4 (Figura 9A). El factor B ofrece una comparación entre el campo NMA y el PDB del complejo acoplado; sin embargo, las tendencias de estas no resultaron similares con valores más altos de PDB para ambos

complejos (Figura 8B-9B). El gráfico de varianza indica la varianza individual en barras de color rojo y la varianza acumulada en barras de color verde (Figura 8C- 9C). El valor propio simulado fue de  $3.44275e-06$  del acoplamiento con el receptor TLR2 y  $5.548535e-06$  con TLR4 (Figura 8D-9D). En el mapa de covarianza se indica el movimiento correlacionado entre un par de residuos en color rojo, el movimiento no correlacionado en color blanco y el movimiento anticorrelacionado en color azul (Figura 8E-9E). El mapa elástico del complejo representa la conexión entre los átomos y las regiones grises más oscuras corresponden a las regiones más rígidas (Figura 8F-9F) [98, 100].

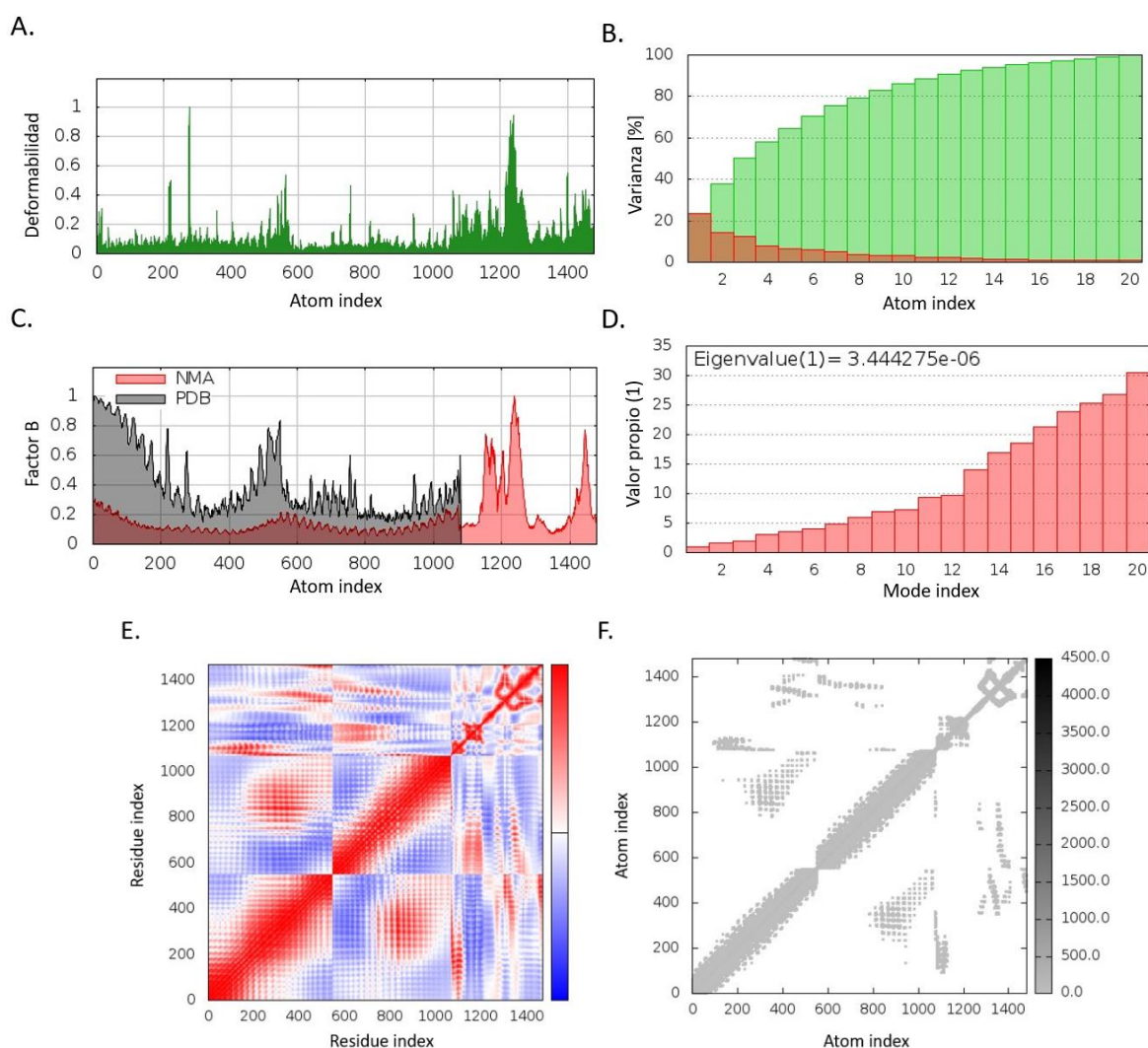


Figura 8. Simulación de dinámica molecular del complejo acoplado TLR2 y vacuna. (A) Índice de deformabilidad (B) análisis de fluctuaciones atómicas de trayectoria del complejo mediante el cálculo del factor B; (C) análisis de varianza; (D) valor propio del sistema del complejo obtenido como  $3.444275e-06$ ; (E) análisis de matriz de covarianza; y (F) análisis de red elástica del complejo vacuna-TLR2.



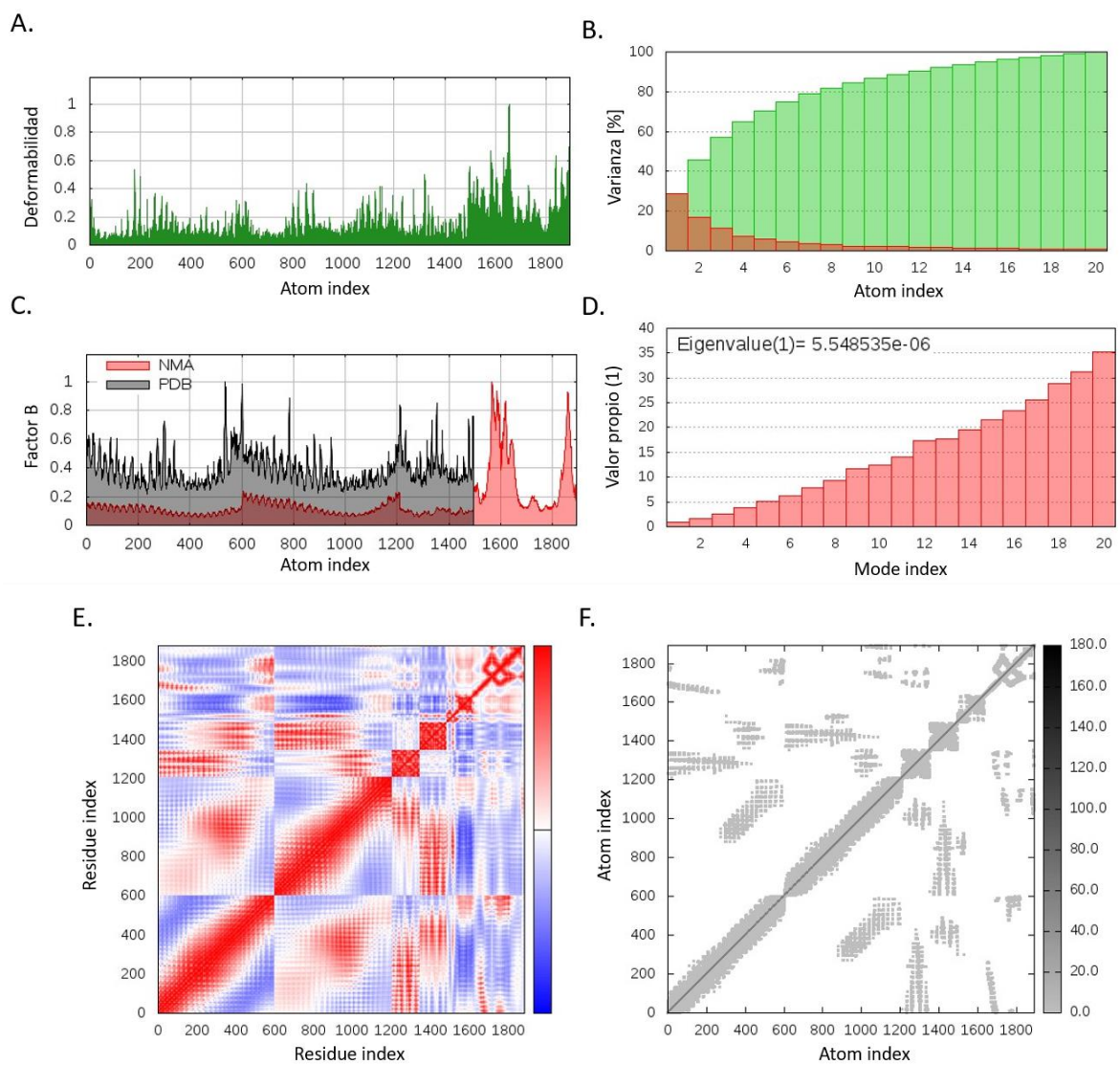


Figura 9. Simulación de dinámica molecular del complejo acoplado TLR4 y vacuola. (A) Índice de deformabilidad (B) análisis de fluctuaciones atómicas de trayectoria del complejo mediante el cálculo del factor B; (C) análisis de variancia; (D) valor propio del sistema del complejo obtenido como  $5.548535 \times 10^{-6}$ ; (E) análisis de matriz de covarianza; y (F) análisis de red elástica del complejo vacuola-TLR4.

## CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La vacunación es una de las estrategias más económicas y eficientes para la prevención a largo plazo contra enfermedades infecciosas [11]. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado una vacuna adecuada para leishmaniasis. El desarrollo de las herramientas inmunoinformáticas y la disponibilidad de datos de la proteómica de parásitos como *Leishmania* se utilizan para identificar posibles dianas para el diseño de vacunas de multi-epítomos [29]. Estos enfoques ahorran tiempo y son menos costosos. Para diseñar la propuesta de una posible vacuna de múltiples epítomos contra *Leishmania*, se realizó un enfoque combinado a partir de epítomos y antígenos reportados experimentalmente con capacidad inmunogénica.

Con el objetivo de identificar epítomos conservados para la vacuna diseñada, se obtuvieron 3 epítomos CD8+ y 5 epítomos CD4+ de los 66 epítomos de MHC de clase I y 55 de MHC de clase II encontrados originalmente en IEDB. Los epítomos seleccionados provienen de los antígenos KMP-11 y GP63, informados como dianas de interés en investigaciones *in silico* e *in vitro* para el diseño de vacunas contra *Leishmania* [101,102]. La proteína KMP-11 se ha asociado con estructuras de membrana en la superficie celular, bolsa flagelar y vesículas intracelulares. Además, su expresión superficial se da en promastigotes y amastigotes [103]. KMP-11 se ha considerado como un candidato ideal a vacuna debido a su alta homología entre especies de *Leishmania*, baja homología a proteínas humanas y alta antigenicidad a células T murinas y humanas [104]. De manera similar, GP63 es una glicoproteína de superficie presente en ambas formas parasitarias y muestra una alta homología entre las especies [3]. GP63 desempeña una actividad catalítica como metaloproteínasa que influye en los mecanismos de señalización del huésped, lo que permite proteger al parásito en los macrófagos [105].

Además de los epítomos de KMP-11 y GP63, se incluyó 4 epítomos afines a CD8+ y 4 epítomos afines a CD4+ de los epítomos predichos de H2B, LmlRAB y PSA, ensayos *in vitro* mostraron resultados alentadores respecto a la inmunogenicidad de estos antígenos [28]. La histona H2B desempeña un rol importante en el empaquetamiento del ADN, la transcripción y la regulación génica, se ha informado como potente candidata a vacuna contra LC [106]. LmlRAB es una proteína específica y altamente conservada entre las especies de *Leishmania*. Se ha sugerido que cumplen un rol relacionado a las actividades



endocíticas y exocíticas de las células, además de producir niveles significativos de IFN- $\gamma$  en pacientes recuperados de LC [107]. Las proteínas PSA están implicadas en la resistencia a la lisis y adhesión a los macrófagos, se ha evidenciado que su forma recombinante generaba respuesta dominante de células Th1 y células citotóxicas [108].

Respecto a otras investigaciones en las que se realizó predicción de epítomos a partir de los antígenos incluidos en este diseño, no se obtuvo los mismos resultados. En el caso de Hamrouni et al. [28], ningún epítomo mostró similitud a los predichos en este estudio. La principal diferencia fue la metodología de predicción basada en la generación de fragmentos consenso a partir de MSA y herramientas de predicción de afinidad a HLA. Por otra parte, 5 de los epítomos predichos y utilizados en el diseño propuesto son similares a los epítomos obtenidos por Hashemzadeh et al. [102] para los antígenos GP63 y KMP-11. Al igual con el estudio de Rabiena et al. [31] se observó que secciones de 2 de los epítomos predichos solaparon. Sin embargo, en estas dos últimas investigaciones las predicciones no parten de MSA. De manera que la predicción de epítomos puede variar de acuerdo a las herramientas y estrategias que se emplean. Esto destaca la importancia de hacer estudios complementarios *in vitro* que permitan confirmar el potencial de los epítomos predichos *in silico*.

Los epítomos elegidos se identificaron como no tóxicos, con un alto grado de conservación, con posible capacidad inmunogénica y afines a HLA. Se realizó el empalmando de epítomos con la ayuda de enlazadores flexibles AYY y GPGPG, estos son enlazadores flexibles que además de mantener la conexión entre los dominios, permite la flexibilidad y estabilidad de la proteína [108]. El enlazador AAY mejora la presentación de los epítomos afines a CD8+ al producir sitios adecuados para la unión al transportador TAP. Mientras que la unión de los epítomos CD4+ por el enlazador GPGPG estimula las respuestas de CD4+ y conserva la inmunogenicidad [75,108]. Para mejorar la inmunogenicidad se fusionó el adyuvante ribosomal 50S proteína L7 / L12 (Locus RL7\_MYCTU) al N-terminal con la ayuda del enlazador EAAAK. El enlazador helicoidal EAAAK es un enlazador rígido que reduce la interacción con otra región de la proteína al fijar la distancia entre los dominios funcionales, proporciona estabilidad y bioactividad en la estructura del péptido de la vacuna [75,102]. Por otra parte, se ha demostrado que el adyuvante 50S L7/L12 luego de su reconocimiento por el receptor TLR4 mejora la polarización de células CD4+ y CD8+ a través de la maduración de las células dendríticas [109]. De manera que la construcción de

la vacuna multi-epítopo propuesta además de contar con epítomos viables, está formulada con enlazadores y un adyuvante que podría sugerir una vacuna eficaz.

La combinación final de epítomos logró un valor de PPC acumulativo de 93.61% a nivel mundial. Aunque el cálculo no fue posible para algunos haplotipos HLA-DQA1/DQB1, con el uso de la base de datos de Alelos Humanos se observó que se distribuían en varias regiones endémicas de leishmaniasis. Los epítomos CD8+ mostraron afinidades de unión a seis alelos HLA-A (A\*01, A\*02, A\*23, A\*24, A\*30, A\*32) y siete alelos HLA-B (B\*15, B\*35, B\*40, B\*44, B\*53, B\*57, B\*58). Mientras los epítomos de CD4+ se unen a varios alelos HLA-DPA1, DPB1, DRB1, DRB3 y HLA-DQB1. Varios de estos alelos se han asociado a la susceptibilidad a LC en poblaciones brasileñas (A\*02~B\*44~DRB1\*07, A\*24~B\*35~DRB1\*01) [83] y mexicanas (DRB1 \* 04, DPA1 \* 04, DPB1 \* 01) [110]. Estos resultados sugieren que la vacuna multi-epítopo diseñada es viable en términos a su afinidad a HLA susceptibles a esta enfermedad y el alto porcentaje de cobertura poblacional. Aunque son varios estudios que se basan en la herramienta de IEDB para el cálculo de PPC; esta metodología aún presenta limitaciones debido a la falta de conocimiento de la distribución de los alelos y haplotipos HLA [111]. Además, se requiere más estudios para verificar los resultados disponibles y conocer la situación de susceptibilidad a LC en otras regiones endémicas y de importancia epidemiológica [112].

Por otra parte, las características y propiedades del diseño multi-epítopo propuesto fueron comparables a otras investigaciones. Se obtuvo una longitud cercana a otros diseños contra *Leishmania* de 352 [113] y 528 aminoácidos [29]. El peso molecular fue 41.2 kDa, encontrándose dentro del rango (40-50 kDa) del valor promedio para una vacuna multi-epítopo [75]. La puntuación de antigenicidad fue de 0.895206, una puntuación comparable a otras vacunas multi-epítopo para *Leishmania* con valores de a 0.8 [30] y 0.95 [102]. También se observó que la vacuna posee una vida media en mamíferos, levaduras y *E. coli* que concuerda con diseños previos [29,92]. Además, la evaluación en los servidores AllerTOP y AllergenFP indicó que la vacuna no es alergénica.

El análisis de las propiedades fisicoquímicas sugiere que la vacuna es estable, hidrofílica y termoestable. El índice de inestabilidad se calculó por debajo de 40, lo que clasifica la proteína como estable [81]. El valor GRAVY negativo demuestra la naturaleza hidrofílica de la vacuna. Mientras que el índice alifático alto, indica una mayor

termostabilidad [113]. Adicional, el pI teórico predicho indica la naturaleza ácida de la proteína. Lo que podría ser muy útil para seleccionar y optimizar los métodos para su purificación en estudios posteriores [113].

Los análisis de estructura secundaria indicaron que la proteína multi-epítipo consistía mayormente en hélices  $\alpha$  y estructuras al azar (random coils). Las hélices  $\alpha$  son estructuras muy regulares y no se deforman fácilmente debido a la presencia de enlaces de hidrógeno, que actúan para mantener la estabilidad estructural. Sin embargo, las hélices  $\alpha$  se encuentran dentro de la proteína, lo que dificulta la interacción con otras moléculas. [114,115]. Por el contrario, las estructuras al azar están expuestas en la superficie de una proteína, propensas a deformarse de acuerdo a las necesidades funcionales de la proteína, siendo estas últimas estructuras las más adecuadas para formar epítopos potenciales [114,115].

En el caso de la estructura 3D, la calidad de predicción se verificó por el bajo valor del parámetro P [116], y por el uso de la plantilla de modelamiento empleada en la predicción de otros diseños multi-epítopos [29,117]. Así mismo, el mejor modelo refinado de la estructura mostró una mejor precisión debido al valor más próximo a 1. Mientras que las puntuaciones más bajas de RMSD y MolProbity indicaron que el modelo está cerca de su estado nativo y realista [118]. Adicionalmente, el análisis de Ramachandran indicó que gran parte de los residuos se encontraban en regiones favorecidas. Se validó el modelo 3D como una estructura de buena resolución por su alto puntaje de factor de calidad [119] y puntuación Z que se encuentra en la trama de las estructuras determinadas resueltas por experimentos cristalográficos de rayos X [89].

La interacción molecular de la vacuna a través del análisis realizado por PatchDock/FireDock obtuvo puntuaciones de energía de enlace de -10.03 y -8.84 kJ/mol; lo que sugiere que el candidato tiene afinidad por los receptores TLR2 y TLR4, respectivamente. TLR4 y TLR2 se han implicado en el reconocimiento de *Leishmania* ya que conducen a la inflamación [120]. Ensayos en modelos murinos infectados por *L. major* han demostrado que la ausencia de TLR2 conduce al desarrollo de una enfermedad más grave y una mayor carga parasitaria [121]; así como la supresión de TLR4 resultó en un aumento de lesiones cutáneas y el tratamiento agonista a este receptor disminuyó el desarrollo de la enfermedad [3]. De manera que el acoplamiento de la posible vacuna a estos receptores podría iniciar una respuesta inmune. Sin embargo, el diseño presentado muestra una

menor capacidad de interacción con los receptores en comparación a los valores más altos de energía global obtenidos por otros candidatos multi-epítomos para leishmaniasis [74,92].

También se realizó un estudio de dinámica molecular para determinar la estabilidad del complejo. El análisis de distorsión de bisagras oscila alrededor de 0.4 en el complejo con TLR2 y 0.6 en la interacción con TLR4, estudios vinculados a la estabilidad de vacunas multi-epítomo con este receptor obtuvieron resultados similares [122,123]. Además, se observó que el sistema complejo sigue el algoritmo de análisis de modo normal con pocas fluctuaciones atómicas del complejo. Sin embargo, el valor propio obtenido en ambos complejos ( $e-06$ ) es cercano a otros resultados reportados con baja deformabilidad [123,124]. Este valor tiene relación con la energía que se requiere para deformar el complejo; un valor propio más bajo representa una deformabilidad más fácil [125]. Además, se obtuvieron matrices de covarianza y red elástica. Las observaciones realizadas para el análisis de covarianza estuvieron en concordancia con la rigidez; los tramos que mostraron el mayor movimiento correlacionado también mostraron un alto grado de rigidez. Sugiriendo estos resultados que las interacciones de acoplamiento con los receptores son complejos de baja deformabilidad y estables.

La simulación inmune mostró resultados consistentes con las respuestas inmunes reportadas *in silico* e *in vitro* de formulaciones de epítomos para *L. major* [28], *L. donovani* [30], *L. infantum* [126] y *L. braziliensis* [55]; caracterizada por altos niveles de IFN- $\gamma$  e IL-2, y bajos niveles de IL-10. Después de una exposición repetida a la vacuna multi-epítomo, hubo un aumento general en las respuestas inmunes generadas. En la leishmaniasis, la producción de IFN- $\gamma$  está implicada en la protección de la enfermedad por la estimulación en la generación de óxido nítrico y el estallido respiratorio en macrófagos para la destrucción de los parásitos [22]. Otra observación interesante fue el incremento de IL-2, un factor de crecimiento que promueve la secreción de citocinas, proliferación y actividad citolítica de las células CD4+, CD8+ y NK [127]. Junto con IFN- $\gamma$ , IL-2 facilita la respuesta Th1 y la activación de macrófagos para la eliminación del parásito *Leishmania*. Los linfocitos T Th1 CD4+ y CD8+ son unas de las principales células en secretar estos productos [127, 128].

Respecto a IL-10, esta citocina antiinflamatoria ha estado relacionada en la persistencia del parásito y patología de la enfermedad, pero también en el control de una respuesta inflamatoria excesiva de Th1 y sus citocinas, especialmente IFN- $\gamma$  en LC [127,

128]. Se ha sugerido que la relación IFN- $\gamma$ /IL-10 influye en el éxito de la vacunación en experimentos murinos [127]. El incremento de las poblaciones de células Th y Tc fue evidente luego de la presentación de la vacuna, lo cual es esperado considerando que la vacuna está compuesta por epítomos T. Además, se observaron altos niveles de inmunoglobulinas y poblaciones de células B. A pesar de ser una respuesta generalmente esperada en la generación de una respuesta humoral no representan un papel importante en la protección frente a *Leishmania*. Los anticuerpos son poco eficaces para la eliminación del parásito, ya que estos se protegen en una vacuola y los altos niveles de anticuerpos se ha relacionado con la patología en la leishmaniasis visceral [129, 130].

La vacuna diseñada en este trabajo muestra potencial inmunogénico y requerimientos teóricos adecuados para ser considerada para evaluaciones experimentales. Las siguientes fases implicarían el diseño *in silico* de un plásmido recombinante, la expresión en *E. coli* y la purificación de la proteína del multi-epítomo. Seguido, se podría realizar la estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LC y personas sanas [28]. Como también la inmunización en modelos de ratones [34].

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este estudio, se utilizaron herramientas inmunoinformáticas para diseñar una vacuna multi-epítopo contra la leishmaniasis cutánea a partir de epítomos y antígenos reportados experimentalmente con capacidad inmunogénica. Las evaluaciones inmunoinformáticas confirmaron la eficacia de la vacuna en términos de antigenicidad, cobertura de población, propiedades fisicoquímicas, simulación de respuesta inmune e interacción con los receptores. Además, los resultados de estas evaluaciones eran comparables a otros estudios *in silico* para leishmaniasis. Sin embargo, los estudios experimentales siguen siendo cruciales para validar el potencial inmunogénico de la vacuna diseñada. La siguiente fase proyectada para culminar el trabajo *in silico* conllevaría diseñar un vector y expresar el multi-epítopo en un sistema bacteriano para realizar ensayos inmunológicos con el fin de validar los resultados obtenidos mediante inmunoinformática.

Aunque en este diseño se logró una cobertura mundial favorable, la comprensión del alcance en las poblaciones aún es incierta. Para futuros estudios en inmunoinformática se requiere conocimiento actualizado de las frecuencias alélicas HLA. Se espera que este enfoque *in silico* sea de contribución a los esfuerzos colectivos en las investigaciones para el desarrollo de una vacuna contra LC.

## REFERENCIAS

1. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: A review. *F1000 Research*. 2017;6: 1–15.
2. Rao V, Durvasula R. *Dynamic Models of Infectious Diseases. Volumen 1: Vector-Borne Diseases*. 1st ed. New York: Springer; 2013.
3. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2016;9(1): 1–15.
4. Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1): 58–85.
5. Ruiz-Postigo J, Grouta L, Jain S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Weekly epidemiological record WHO*. 2020;95: 265–280.
6. Whyte D, Zufferey R. Cutaneous Leishmaniasis: Update on Vaccine Development. *Hum Parasit Dis*. 2017;9.
7. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Seminars*. 2018;392(10151): 1–20.
8. Moafi M, Rezvan H, Sherkat R, Taleban R. Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *Int J Prev Med*. 2019;10: 95.
9. Cecílio P, Oliveira F, Silva A. Vaccines for human leishmaniasis: where do we stand and what is still missing? In: Afrin F, Hemeg H, editors. *Leishmaniasis as re-emerging diseases*. IntechOpen; 2018. pp. 59-93.
10. Chauhan V, Rungta T, Goyal K, et al. Designing a multi-epitope based vaccine to combat Kaposi Sarcoma utilizing immunoinformatics approach. *Sci Rep*. 2019;9: 2517.
11. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther*. 2018;12: 25–40.
12. Piazza FM. A Study of the Efficacy and Safety of the LEISH-F2 + MPL-SE Vaccine for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis; 2013 [citado 20 Feb 2021]. Database: ClinicalTrials.gov [Internet]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01011309>
13. Iborra S, Solana JC, Requena JM, Soto M. Vaccine candidates against leishmania under current research. *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(4): 323–34.
14. De Brito RCF, Cardoso JM d. O, Reis LES, Vieira JF, Mathias FAS, Roatt BM, et al. Peptide vaccines for leishmaniasis. *Front Immunol*. 2018;9: 1043.
15. Dhanda SK, Usmani SS, Agrawal P, Nagpal G, Gautam A, Raghava GPS. Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. *Brief Bioinform*. 2017;18(3): 467–78.
16. Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J Immunol Res*. 2017;2017: 2680160.
17. Oli AN, Obialor WO, Ifeanyichukwu MO, et al. Immunoinformatics and Vaccine Development: An Overview. *Immunotargets Ther*. 2020;9: 13-30.
18. Kar T, Narsaria U, Basak S, et al. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. *Science Reports*. 2020;10(1):10895.
19. Saylor K, Gillam F, Lohneis T, Zhang C. Designs of Antigen Structure and Composition for Improved Protein-Based Vaccine Efficacy. *Front Immunol*. 2020;11: 283.
20. Stewart J. Parasitic infections: Pathogenesis and immunity. In: Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W, editors. *Medical Microbiology (Eighteenth Edition)*. Churchill Livingstone; 2012. pp. 144-150.
21. Dos Santos Meira C, Gedamu L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. *Microorganisms*. 2019;7(12): 695.
22. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9): 581–92.

23. Singh RK, Srivastava A, Singh N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiological research*. 2012;167(8): 445-451.
24. Llanes A, Restrepo CM, Lleonart R. VianniaTopes: A database of predicted immunogenic peptides for *Leishmania* (*Viannia*) species. *Database*. 2018;2018: 1–12.
25. Alves-Silva MV, Nico D, De Luca PM, Palatnik De-Sousa CB. The F1F3 Recombinant Chimera of *Leishmania donovani*-Nucleoside Hydrolase (NH36) and Its Epitopes Induce Cross-Protection against *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* Infection in Mice. *Front Immunol*. 2019;10: 1–21.
26. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*. 2013;82: 155–84.
27. Boussoffara T, Boubaker MS, Ben Ahmed M, Mokni M, Feriani S, Ben Salah A, et al. Activated cytotoxic T cells within zoonotic cutaneous leishmaniasis lesions. *Immun Inflamm Dis*. 2019;7(3): 95–104.
28. Hamrouni S, Bras-Gonçalves R, Kidar A, Aoun K, Chamakh-Ayari R, Petitdidier E, et al. Design of multi-epitope peptides containing hla class-i and class-ii-restricted epitopes derived from immunogenic *Leishmania* proteins, and evaluation of CD4+ and CD8+ T cell responses induced in cured cutaneous leishmaniasis subjects. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14(3): 1–31.
29. Khatoon N, Pandey RK, Prajapati VK. Exploring *Leishmania* secretory proteins to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine using immunoinformatics approach. *Sci Rep*. 2017;7: 8285.
30. Khan MAA, Ami JQ, Faisal K, Chowdhury R, Ghosh P, Hossain F, et al. An immunoinformatic approach driven by experimental proteomics: in silico design of a subunit candidate vaccine targeting secretory proteins of *Leishmania donovani* amastigotes. *Parasit Vectors*. 2020;13(1): 196.
31. Rabienia M, Roudbari Z, Ghanbariasad A, Abdohalli A, Mohammadi E, Mortazavidehkordi N, et al. Exploring membrane proteins of *Leishmania major* to design a new multi-epitope vaccine using immunoinformatics approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;152: 105423.
32. Vakili B, Eslami M, Hatam GR, Zare B, Erfani N, Nezafat N et al. Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against *Leishmania infantum*. *Int J Biol Macromol*. 2018;120(Pt A): 1127-1139.
33. E Silva Rde F, Ferreira LF, Hernandez MZ, de Brito ME, de Oliveira BC, da Silva AA, et al. Combination of In Silico Methods in the Search for Potential CD4(+) and CD8(+) T Cell Epitopes in the Proteome of *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol*. 2016;7: 327.
34. Vakili B, Nezafat N, Zare B, Erfani N, Akbari M, Ghasemi Y, et al. A new multi-epitope peptide vaccine induces immune responses and protection against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(1): 69-79.
35. Michel-Todó L, Reche PA, Bigey P, Pinazo MJ, Gascón J, Alonso-Padilla J. In silico Design of an Epitope-Based Vaccine Ensemble for Chagas Disease. *Front Immunol*. 2019;10(Nov): 1–16.
36. Murphy D, Reche P, Flower DR. Selection-based design of in silico dengue epitope ensemble vaccines. *Chem Biol Drug Des*. 2019;93(1): 21–8.
37. Damfo SA, Reche P, Gatherer D, Flower DR. In silico design of knowledge-based *Plasmodium falciparum* epitope ensemble vaccines. *J Mol Graph Model*. 2017;78: 195–205.
38. Sheikh QM, Gatherer D, Reche PA, Flower DR. Towards the knowledge-based design of universal influenza epitope ensemble vaccines. *Bioinformatics*. 2016;32(21): 3233–9.
39. Pan American Health Organization. Neglected Infectious Diseases: Leishmaniasis Epidemiological Report of the Americas. [Internet]. Report Pan American Health Organization/World Health Organization. 2017 [citado 03 Jul 2020]. Disponible en:



- <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-leishmaniasis-factsheet-work.pdf>
40. Global Health Observatory Data. Leishmaniasis: Situation and trends. World Health Organization. [Internet]. 2019 [citado 03 Jul 2020]. Disponible en: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/)
  41. World Health Organization. Leishmaniasis. [Internet]. Fact Sheets. 2020 [citado 03 Jul 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
  42. Okwor I, Uzonna J. Social and economic burden of human leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(3): 489–93.
  43. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(10): 925–32.
  44. World Health Organization. Leishmaniasis. [Internet]. 2020 [citado 03 Jul 2020]. Disponible en: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)
  45. Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, De Martino F, Medina J, et al. An interactive database of Leishmania species distribution in the Americas. *Sci Data.* 2020;7(1): 1–7.
  46. Ministerio de Salud Pública. Enfermedades transmitidas por vectores en Ecuador. 2021 [citado 20 Feb 2021]. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/Vectores-SE-52.pdf>
  47. Gómez LJ, van Wijk R, van Selm L, Rivera A, Barbosa MC, Parisi S, et al. Stigma, participation restriction and mental distress in patients affected by leprosy, cutaneous leishmaniasis and Chagas disease: a pilot study in two co-endemic regions of eastern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2020;114(7): 476–482.
  48. Khanjani N, González U, Leonardi-Bee J, Mohebbi M, Saffari M, Khamesipour A. Vaccines for preventing cutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;2018(1): 2–5.
  49. De Luca PM, Macedo ABB. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. *Front Immunol.* 2016;7(APR): 1–8.
  50. Bailey F, Mondragon-Shem K, Hotez P, Ruiz-Postigo JA., Al-Salem W, Acosta-Serrano A, Molyneux DH. A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. *PLoS neglected tropical diseases.* 2017;11(8): e0005739.
  51. Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J Biomed Inform.* 2015;53: 405–14.
  52. Ebrahimi S, Mohabatkar H. Prediction of T-cell epitopes for designing a reverse vaccine against streptococcal bacteria. *Mol Biol Res Commun.* 2018;7(1): 35–41.
  53. Reche P, Flower DR, Fridkis-Hareli M, Hoshino Y. Peptide-based immunotherapeutics and vaccines 2015. *J Immunol Res.* 2015;2015: 2–4.
  54. e Silva RF, de Oliveira BC, da Silva AA, Brelaz de Castro MCA, Ferreira LFGR, Hernandez MZ, et al. Immunogenicity of Potential CD4+ and CD8+ T Cell Epitopes Derived From the Proteome of Leishmania braziliensis. *Front Immunol.* 2020;10(Feb): 1–14.
  55. Waller FM, Reche PA, Flower DR. West Nile Virus Vaccine Design by T Cell Epitope Selection: In Silico Analysis of Conservation, Functional Cross-Reactivity with the Human Genome, and Population Coverage. *J Immunol Res.* 2020;2020: 7235742.
  56. Salvador EA, Pires de Souza GA, Cotta Malaquias LC, Wang T, Leomil Coelho LF. Identification of relevant regions on structural and nonstructural proteins of Zika virus for vaccine and diagnostic test development: an in silico approach. *New Microbes New Infect.* 2019;29: 100506.
  57. Madeira F, Park YM, Lee J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs. *Nucleic Acids Research.* 2019 Jul;47(W1): W636-W641.

58. Immunomedicine Group UCdM. Software to Calculate Sequence Identity and Similarity-SIAS. 2015 [citado 20 Feb 2021]. Disponible en: <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>
59. Garcia-Boronat M, Diez-Rivero C, Reinherz E, Reche P. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(2): W35–W41.
60. Jurtz V, Paul S, Andreatta M, Marcatili P, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.0: Improved Peptide–MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *The Journal of Immunology*. 2017;199(9): 3360-3368.
61. Shah P, Mistry J, Reche PA, Gatherer D, Flower DR. In silico design of Mycobacterium tuberculosis epitope ensemble vaccines. *Mol Immunol*. 2018;97: 56-62.
62. Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol*. 2008;4(4): e1000048.
63. Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*. 2010;11: 568.
64. Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, Greenbaum J, et al. Immune epitope database analysis resource. *Database*. 2012.
65. Nielsen M, Lundegaard C, Wornig P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci*. 2003;12: 1007-101.
66. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: Accurate web accessible predictions of Human, Mouse, and Monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. 2008;36: W509-512.
67. Andreatta M. and Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2016;32: 511-7.
68. Mohan M, Haribalaganesh R, Coico R, Sundar K. HLA-directed bioinformatics approach for genome-wide mapping of dengue CTL epitopes. *Future Virology*. 2018;(13)5: 331-342.
69. Calis JJA, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comp Biol*. 2013;9(10): e1003266.
70. Dhanda S, Vir P, Raghava G. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biology Direct*. 2013;8(1): 30.
71. Bui H, Sidney J, Dinh K, Southwood S, Newman M. J, Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2006;17: 153.
72. Bui HH, Sidney J, Li W, Füsseder N, Sette A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2007;8(1): 361.
73. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava G, et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS ONE*. 2013;8: e73957.
74. Khatoon N, Pandey RK, Ojha R, Aathmanathan VS, Krishnan M, Prajapati VK. Exploratory algorithm to devise multi-epitope subunit vaccine by investigating *Leishmania donovani* membrane proteins. *J Biomol Struct Dyn*. 2019;37(9): 2381-2393.
75. Kumar Pandey R, Ojha R, Mishra A, Kumar Prajapati V. Designing B- and T-cell multi-epitope based subunit vaccine using immunoinformatics approach to control Zika virus infection. *J Cell Biochem*. 2018;119(9): 7631-7642.
76. Saadi M, Karkhah A, Nouri HR. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017;51: 227-234.

77. Shey RA, Ghogomu SM, Esoh KK, Nebangwa ND, Shintouo CM, Nongley NF, et al. In-silico design of a multi-epitope vaccine candidate against onchocerciasis and related filarial diseases. *Sci Rep.* 2019;9(1): 4409.
78. Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, Baldi P. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2005;33: W72-W76.
79. Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v.2-A server for in silico prediction of allergens. *J Mol Model.* 2014;20(6): 2278.
80. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics.* 2013;30: 846–851.
81. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M, editor. *The Proteomics Protocols Handbook.* Humana Press; 2005. pp. 571-607.
82. Rapin N, Lund O, Bernaschi M, Castiglione F. Computational immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. *PLoS One.* 2010;5(4): e9862.
83. Ribas-Silva RC, Ribas AD, Dos Santos MC, et al. Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of Southern Brazil. *BMC Infect Dis.* 2013;13: 198.
84. Buchan DWA, Jones DT. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1): W402-W407.
85. Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc.* 2012;7(8): 1511-1522.
86. Peng J, Xu J. RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins.* 2011;79(Suppl 10): 161-171.
87. Xu D, Zhang Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J.* 2011;101(10): 2525-2534.
88. Heo L, Park H, Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue): W384-W388.
89. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue): W407-W410.
90. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 1993;2: 1511–1519.
91. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* 1993;26: 283-291.
92. Singh G, Pritam M, Banerjee M, Singh AK, Singh SP. Designing of precise vaccine construct against visceral leishmaniasis through predicted epitope ensemble: a contemporary approach. *Computational biology and chemistry.* 2020;86: 107259.
93. Tian W, Chen C, Lei X, Zhao J, Liang J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1): W363-W367.
94. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In Gusfield et al., editors. *Proceedings of the 2'nd Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI), Lecture Notes in Computer Science.* Springer Verlag. 2002. pp. 185-200.
95. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucl Acids Res.* 2005;33: W363-367.
96. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: Fast Interaction Refinement in Molecular Docking. *Proteins.* 2007;69(1): 139-159.

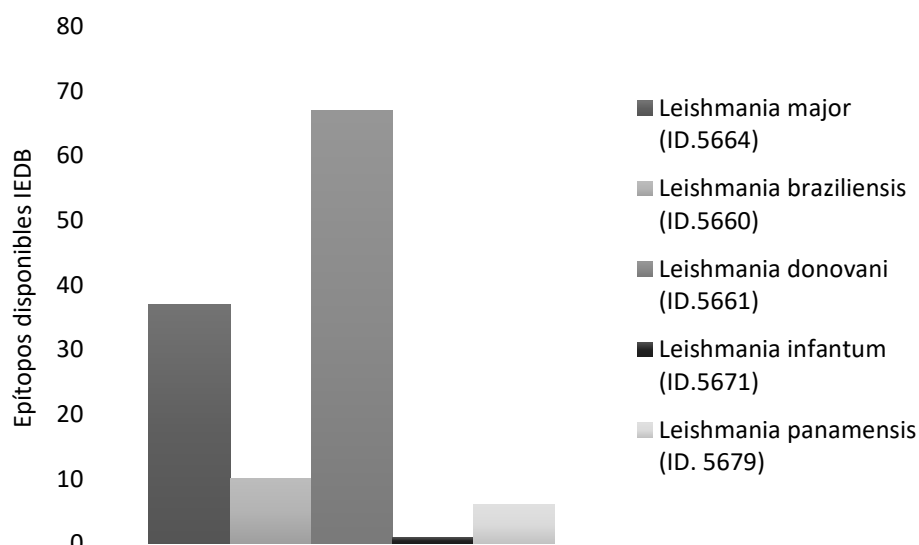
97. Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue): W229-32.
98. López-Blanco JR, Aliaga JI, Quintana ES, Chacón P. iMODS: internal coordinates normal mode analysis server. *Nucleic Acids Res.* 2014;42: W271–W276.
99. Jakhar R, Gakhar SK. An Immunoinformatics Study to Predict Epitopes in the Envelope Protein of SARS-CoV-2. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.* 2020 (2020): 7079356.
100. Hasan M, Ghosh P, Azim KF, Mukta S, Abir RA, Nahar J, Khan M. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope subunit vaccine against avian influenza A (H7N9) virus. *Microbial pathogenesis.* 2019;130: 19-37.
101. Zhang J, He J, Li J, Zhou Q, Chen H, Zheng Z, et al. The immunogenicity and protective immunity of multi-epitopes DNA prime-protein boost vaccines encoding Amastin-Kmp-11, Kmp11-Gp63 and Amastin-Gp63 against visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2020;15(3): e023038.
102. Hashemzadeh P, Ghorbanzadeh V, Lashgarian HE, Kheirandish F, Dariushnejad H. Harnessing Bioinformatic Approaches to Design Novel Multi-epitope Subunit Vaccine Against *Leishmania infantum*. *Int J Pept Res Ther.* 2020;26: 1417–1428.
103. Sannigrahi A, Mullick D, Sanyal D, Sen S, Maulik U, Chattopadhyay K. Effect of Ergosterol on the Binding of KMP-11 with Phospholipid Membranes: Implications in Leishmaniasis. *ACS Omega.* 2019;4(3): 5155-5164.
104. de Mendonça SC, Cysne-Finkelstein L, Matos DC. Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*. *Front Immunol.* 2015;6: 524.
105. Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2: 72.
106. Baharia RK, Tandon R, Sahasrabudhe AA, Sundar S, Dube A. Nucleosomal histone proteins of *L. donovani*: a combination of recombinant H2A, H2B, H3 and H4 proteins were highly immunogenic and offered optimum prophylactic efficacy against *Leishmania* challenge in hamsters. *PLoS One.* 2014;9(6): e97911.
107. Chamakh-Ayari R, Chenik M, Chakroun AS, Bahi-Jaber N, Aoun K, Meddeb-Garnaoui A. *Leishmania* major large RAB GTPase is highly immunogenic in individuals immune to cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2017;10(1): 185.
108. Dong R, Chu Z, Yu F, Zha Y. Contriving Multi-Epitope Subunit of Vaccine for COVID-19: Immunoinformatics Approaches. *Front Immunol.* 2020;11: 1784.
109. Lee SJ, Shin SJ, Lee MH, Lee MG, Kang TH, Park WS, et al. A potential protein adjuvant derived from *Mycobacterium tuberculosis* Rv0652 enhances dendritic cells-based tumor immunotherapy. *PLoS One.* 2014;9(8): e104351.
110. Olivo-Diaz A, Debaz H, Alaez C, Islas VJ, Perez-Perez H, Hobart O, Gorodezky C. Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol.* 2004;65(3): 255–261.
111. Samaranyake N, Fernando SD, Neththikumara NF, Rodrigo C, Karunaweera ND, Dissanayake VH. Association of HLA class I and II genes with cutaneous leishmaniasis: a case control study from Sri Lanka and a systematic review. *BMC infectious diseases.* 2016;16: 292.
112. Requena D, Médico A, Chacón RD, Ramírez M, Marín-Sánchez O. Identification of Novel Candidate Epitopes on SARS-CoV-2 Proteins for South America: A Review of HLA Frequencies by Country. *Frontiers in immunology.* 2020;11: 2008.

113. Sanami S, Zandi M, Pourhossein B, Mobini GR, Safaei M, Abed A. Design of a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2 using immunoinformatics approach. *International journal of biological macromolecules*. 2020;164: 871–883.
114. Li Y, Liu X, Zhu Y, Zhou X, Cao C, Hu X, et al. Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Exp Ther Med*. 2013;6(2): 335-340.
115. Zhou J, Jingjing S, Lu G, Wang W, Wang L. SARS-CoV-2 Spike Protein Evolution may Cause Difficulties for Vaccine. *Research square*. 2020. Disponible en: <https://assets.researchsquare.com/files/rs-80010/v1/e851ab29-e7ff-4eae-befe-b872e0f9c63b.pdf>
116. Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*. 2012;7(8): 1511–1522.
117. Singh A, Thakur M, Sharma LK, Chandra K. Designing a multi-epitope peptide based vaccine against SARS-CoV-2. *Scientific reports*. 2020;10(1): 1-12.
118. Bhattacharya D, Cheng J. 3Drefine: consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization. *Proteins*. 2013;81(1): 119-131.
119. DOE-MBI Services. ERRAT program Help. 2021 [citado 20 Feb 2021]. Disponible en: <https://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/help>
120. Mukherjee S, Karmakar S, Babu SPS. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016;20(2): 193-204.
121. Halliday A, Bates PA, Chance ML, Taylor MJ. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a role in controlling cutaneous leishmaniasis in vivo, but does not require activation by parasite lipophosphoglycan. *Parasit Vectors*. 2016;9(1): 532.
122. Oladipo EK, Ajayi AF, Ariyo OE, Onile SO, Jimah EM, Ezediuno LO, et al. Exploration of surface glycoprotein to design multi-epitope vaccine for the prevention of Covid-19. *Informatics in medicine unlocked*. 2020;21: 100438.
123. Samad A, Ahammad F, Nain Z, Alam R, Imon R, Hasan M, et al. Designing a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020;1-17.
124. Hasan M, Azim KF, Imran MA, Chowdhury IM, Urme SR, Parvez MS, et al. Comprehensive genome based analysis of *Vibrio parahaemolyticus* for identifying novel drug and vaccine molecules: Subtractive proteomics and vaccinomics approach. *PLoS one*. 2020;15(8): e0237181.
125. Sarkar B, Ullah MA, Prottoy HI. Computational Exploration of Phytochemicals as Potent Inhibitors of Acetylcholinesterase Enzyme in Alzheimer's Disease. *medRxiv*. 2020;1(14): 20016535.
126. Dias DS, Ribeiro PAF, Martins VT, Lage DP, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, et al. Vaccination with a CD4+ and CD8+ T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Transl Res*. 2018;200: 18-34.
127. Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*. 2016;110(6): 247-260.
128. Espir T, Figueira LDP, Naiff MD, da Costa AG, Ramalho-Ortigão M, Malheiro A, et al. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in Amazonas state, Brazil. *Journal of immunology research*. 2014;2014.

129. Dubie T, Mohammed Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. *Journal of Immunology Research*. 2020.
130. Nylén S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*. 2010;2(2): 135-46.

## ANEXOS

Anexo 1. Cantidad de epítomos por especie de *Leishmania* recuperados de IEDB. La mayoría de los epítomos colectados pertenecen a *L. major* y *L. donovani*, conteniendo 37 y 67 epítomos, respectivamente.



Anexo 2. Fragmentos conservados obtenidos por el análisis de variabilidad de secuencia de los MSA de los antígenos GP63, KMP11 3'NT/UN. Se obtuvieron fragmentos de longitud mayor a 9 residuos de aminoácidos bajo la métrica métrica de variabilidad de la entropía de Shannon con un umbral de 0.5

Antígeno	Start	End	Secuencia de Epítopo
GP63	14	25	VAARLVRLAAAG
	31	41	AVGTAAAWAHA
	303	314	TAVAKAREQYGC
	480	489	FNVFSDAARC
	579	592	AAGRRGPRAAATAL
KMP11	10	20	AKLDRLEEFN
	22	59	KMQEQNAKFFADKPDESTLSPENKEHYEKFERMIKEHT
	61	74	KFNKKMHEHSEHFK
	76	90	KFAELLEQQKAAQYP
3'NT/UN	23	35	ALPTQAWWDKGHM
	37	45	IAEIARRNL
	64	87	GPFKSTNIVELGPWADDLKSML
	108	124	TINPVEIVNVASVIPML
	140	151	TSVANLIHFVGD
	153	170	HMPLHSADLFSPEYPLGD
	172	180	GGNKQIVIV
	184	202	AGTSMKLHAFWDSMCEGPQ
	217	225	LSAFVDNLV
	228	236	YSFTEEQMM
	243	261	MAAESYELAVKNVYPGISD
	269	277	YKANGKILA
	279	293	GRVTLAGYRLATILN
	302	310	DTIMNGTKH
317	328	VTHTGDTYNYYA	
335	356	GAAAGIFLSSFAIGCLLATAVV	

Anexo 3. Fragmentos conservados obtenidos por el análisis de variabilidad de secuencia de los MSA de los antígenos H2B, PSA, LmIRAB. Se obtuvieron fragmentos de longitud mayor a 9 residuos de aminoácidos bajo la métrica métrica de variabilidad de la entropía de Shannon con un umbral de 0.5

Antígeno	Start	End	Secuencia de epítipo
H2B	72	87	NKKRTLGAREVQTAVR
	89	107	VLPAELAKHAMAEGTKAVS
PSA	4	12	CVRRLVLAA
	18	32	VALLLCTSSAPVARA
	860	869	CEVDGCEVCE
	871	879	DSAARCARC
LmIRAB	42	51	LGDYSVGKTS
	91	102	VTPTVGTDFYSL
	107	128	VVPGASVRLQIWDTAGLEKYAA
	175	184	IMVVANKIDI
	239	247	AIVTARKVQ
	259	267	YAEVSAKTK
	302	312	EVFAHTVLPPH

Anexo 4. Epítipos afines a HLA-I utilizados para diseñar la construcción de vacuna basada en múltiples epítipos. Epítipos provenientes de la predicción de epítipos (EP) e identificación de epítipos conservados (EC). Se identificó como experimental (exp.) a los epítipos de IEDB.

Epítipo	Antíg.	Secuencia	Alelo HLA-I	Inmunogenicidad	Toxicidad	Conservación	% PPC Mundial
EP_1	H2B	AMAEGTKAV	HLA-A*02:01, HLA-A*02:06	0.02385	No	100.00 %	40.60%
EP_2	LmIRAB	GASVRLQIW	HLA-B*57:01, HLA-B*58:01	0.0078	No	100.00 %	7.26%
EP_3		VTPTVGTDFY	HLA-A*01:01, HLA-B*35:01	0.23232	No	100.00 %	24.29%
EP_4		TPTVGTDFY	HLA-B*35:01, HLA-B*53:01	0.2108	No	100.00 %	10.84%
EP_5		LQIWDTAGL	HLA-A*02:06	0.37705	No	100.00 %	1.95%
EC_1	KMP-11	KMQEQNAKF	HLA-A*32:01, HLA-B*15:01, HLA-A*23:01, HLA-B*58:01, HLA-B*57:01, HLA-A*24:02, HLA-A*30:02	Exp.	No	100.00 %	42.60%
EC_2		LEQQKAAQY	HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*15:01, HLA-A*30:02	Exp.	No	100.00 %	23.38%

(continua)



(continuación)

Epítipo	Antíg.	Secuencia	Alelo HLA-I	Inmunogenicidad	Toxicidad	Conservación	% PPC Mundial
EC_3		AELLEQKKA	HLA-B*44:03, HLA-B*44:02, HLA-B*40:01	Exp.	No	100.00 %	20.88%
EC_4		KLDRLEEF	HLA-A*32:01	Exp.	No	100.00 %	4.61%
EC_5		MQEQNAKFF	HLA-B*15:01	Exp.	No	100.00 %	8.44%

Anexo 5. Epítipos HLA-II utilizados para diseñar la construcción de vacuna basada en múltiples epítipos. Epítipos provenientes de la predicción de epítipos (EP) e identificación de epítipos conservados (EC).

Epítipo	Antíg.	Secuencia	Alelos HLA-II	IFN- $\gamma$	Toxicidad	Conservación	% PPC Mundial
EP_6	H2B	AELAKHAMAEG TKAV	HLAQA1*05:01 /DQB1*03:01	0.126	No	100.00 %	0.0
EP_7		VLPAELAKHAM AEGT	HLADQA1*04:01 /DQB1*04:02	0.299	No	100.00 %	0.0
EP_8	Lml RAB	ASVRLQIWDTAG LEK	HLA-DRB4*01:01	1	No	100.00 %	0.0
EP_9		SVRLQIWDTAGL EKY	HLA-DQA1*01:01/ DQB1*05:01	0.558	No	100.00 %	0.0
EP_10		GASVRLQIWDTA GLE	HLA-DRB4*01:01	0.295	No	100.00 %	0.0
EP_11		PGASVRLQIWDT AGL	HLA-DRB4*01:01	0.096	No	100.00 %	0.0
EP_12	PSA	VALLCTSSAPVA RA	HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB1*04:01, HLA-DPA1*02:01/ DPB1*14:01, HLA- DRB1*09:01, HLA- DRB1*07:01, HLA- DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DRB1*01:01	1	No	100.00 %	48.09%
EC_6	KMP- 11	SEHFKQKFAELLE QQ	HLA-DPA1*02:01/ DPB1*01:01, HLA-DRB1*09:01, HLA-DPA1*03:01/ DPB1*04:02, HLA- DPA1*02:01/DPB1*05:01	0.013	No	93.33%	6.40%
EC_7		EHSEHFKQKFAE LLE	HLA- DPA1*02:01/DPB1*01:01, HLA-DRB1*09:01, HLA- DPA1*03:01/DPB1*04:02	0.093	No	93.33%	6.40%
EC_8		EHFQKQKFAELLE QQK	HLA- DPA1*02:01/DPB1*01:01, HLA- DPA1*03:01/DPB1*04:02, HLA- DPA1*02:01/DPB1*05:01	0.155	No	93.33%	0.0
EC_9		FKQKFAELLEQQ KAA	HLA- DPA1*02:01/DPB1*01:01	0.304	No	93.33%	0.0

(continúa)

(continuación)

Epítopo	Antíg.	Secuencia	Alelos HLA-II	IFN-γ	Toxicidad	Conser vación	% PPC Mundial	
EC_10	KMP-11	FKHKFAELLEQQ KAA	HLA- DPA1*02:01/DPB1*01:01	1	No	93.33%	0.0	
EC_11		HFQKFAELLEQ QKA	HLA- DPA1*02:01/DPB1*01:01	0.369	No	93.33%	0.0	
EC_12	KMP-11	EHYEKFERMIKE HTE	HLA-DRB1*11:01, HLA- DPA1*02:01/DPB1*05:01	0.128	No	93.33%	10.54%	
EC_13		YEKFERMIKEHTE KF	HLA-DRB1*11:01, HLA- DPA1*02:01/DPB1*05:01	0.354	No	93.33%	10.54%	
EC_14		EKFERMIKEHTE KFN	HLA-DRB1*11:01	0.395	No	93.33%	10.54%	
EC_15		REHYEKFERMIK EHT	HLA-DRB1*11:01, HLA- DPA1*02:01/DPB1*05:01	0.065	No	93.33%	10.54%	
EC_16		KMP-11	EHYDKFERMIKE HTE	HLA-DRB1*11:01, HLA- DPA1*02:01/DPB1*05:01	0.085	No	86.67%	10.54%
EC_17			YDKFERMIKEHT EKF	HLA-DRB1*11:01, HLA- DPA1*02:01/DPB1*05:01	0.151	No	86.67%	10.54%
EC_18	DKFERMIKEHTE KFN		HLA-DRB1*11:01	0.200	No	86.67%	10.54%	
EC_19	KMP-11	YEEFAAKLDRLDE EF	HLA- DQA1*05:01/DQB1*02:01	0.101	No	93.33%	0.0	
EC_20		GP63	INSSTAVAKARE QYG	HLA- DQA1*01:02/DQB1*06:02	2	No	86.67%	0.0
EC_21			NSSTAVAKAREQ YGC	HLA- DQA1*01:02/DQB1*06:02	3	No	86.67%	0.0

Anexo 6. Búsqueda de la distribución de haplotipos HLA en Allele Frequency Net para los cuales varios epítomos estudiados mostraron afinidad. Se realizó esta búsqueda para comprender la distribución y frecuencia de estos haplotipos, con el fin de identificar su presencia en las regiones endémicas de Leishmania.

Haplotipos	Distribución de regions	Link de acceso
HLA-DRB4*01:01	Norteamérica	<a href="http://www.allelefrequencies.net/hla6008a.asp?hla_allele=DRB4*01:01">http://www.allelefrequencies.net/hla6008a.asp?hla_allele=DRB4*01:01</a>
HLA- DQA1*05:01/DQB1* 03:01	Mundial	<a href="http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*05:01-DQB1*03:01">http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*05:01-DQB1*03:01</a>
HLA- DPA1*02:01/DPB1* 14:01	Norteamérica, América del Sur y Central, Asia del Sur	<a href="http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*02:01-DPB1*14:01">http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*02:01-DPB1*14:01</a>
HLA- DPA1*03:01/DPB1* 04:02	América del Sur y Central	<a href="http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*03:01-DPB1*04:02">http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*03:01-DPB1*04:02</a>
HLA- DPA1*02:01/DPB1* 01:01	América del Sur y Central, Asia del Sur	<a href="http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*02:01-DPB1*01:01">http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*02:01-DPB1*01:01</a>
HLA- DPA1*02:01/DPB1* 05:01	Norteamérica, América del Sur y Central, Asia del Sur, Asia del Norte, África del Norte	<a href="http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*02:01-DPB1*05:01">http://www.allelefrequencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DPA1*02:01-DPB1*05:01</a>

(continua)

(continuación)

Haplotipos	Distribución de regions	Link de acceso
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	Mundial	<a href="http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*01:02-DQB1*06:02">http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*01:02-DQB1*06:02</a>
HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	Mundial	<a href="http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*05:01-DQB1*02:01">http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*05:01-DQB1*02:01</a>
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	Mundial	<a href="http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*05:01-DQB1*03:01">http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*05:01-DQB1*03:01</a>
HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	Mundial	<a href="http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*01:01-DQB1*05:01">http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*01:01-DQB1*05:01</a>
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	Mundial	<a href="http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*04:01-DQB1*04:02">http://www.allelefreqencies.net/hla6014a.asp?hla_haplotype=DQA1*04:01-DQB1*04:02</a>

Anexo 7. Propuestas para el diseño final de la vacuna de múltiples epítomos. Se consideró el valor de cobertura poblacional, el valor de antigenicidad, número de epítomos y diversidad de antígenos como parámetros de selección. Se ha nombrado como EC a los Epítomos Conservados y EP a los Epítomos Predichos.

Criterio	Epítomos		% PPC		Antigenicidad	Antígenos (cantidad de epítomos derivados)
	HLA-I	HLA-II	Mundial	Sudamérica		
Vacuna elegida	EP_1-4, EC_1-3	EP_6-7, EP_9, EP_12, EC_6, EC_13, EC_19-21	93.61%	73.9%	0.895206	LmIRAB (4), H2B (3), PSA (1), KMP (6), GP63 (2)
Mayor %PPC	EP_1-4, EC_1-3	EP_8, EP_11, EC_13, EC_14, EC_16-18	93.61%	73.9%	0.885809	LMIRAB, H2B (1), PSA (1), todos KMP11
Más inmunogénicos	EP_3-5, EC_1-3	EP_6, EP_8-9, EP_12, EC_1, EC_13-14	86.82%	64.49%	0.894478	LmIRAB (4), H2B (2), PSA (1), KMP (7), GP63 (1)
Al menos un epítomo de c/ antig.	EP_1-4, EC_1-3	EP_6, EP_8, EP_10, EP_12, EC_7, EC_18-19, EC_21	93.61%	73.9%	0.902483	LMIRAB(5), H2B (2), PSA (1), KMP11(7), GP63 (1)
Al menos un c/antig, más inmunogénicos, más PPC	EP_1-4, EC_1-3	EP_7-9, EP_12, EC_10, EC_14, EC_18-19, EC_21	93.61%	73.9%	0.904127	LmIRAB (5), H2B (1), PSA (1), KMP (7), GP63 (1)

Anexo 8. Análisis en BLAST de homología de la secuencia multiepítope con proteínas humanas.

**BLAST** » **blastp suite** » results for RID-X81SVPJW013

[← Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) ▾

**i** Your search is limited to records that include: human (taxid:9606)

**Job Title** VME\_12\_Human

**RID** [X81SVPJW013](#) Search expires on 12-13 06:56 am [Download All](#) ▾

**Program** [?](#) [Citation](#) ▾

**Database** nr [See details](#) ▾

**Query ID** lcl|Query\_11261

**Description** None

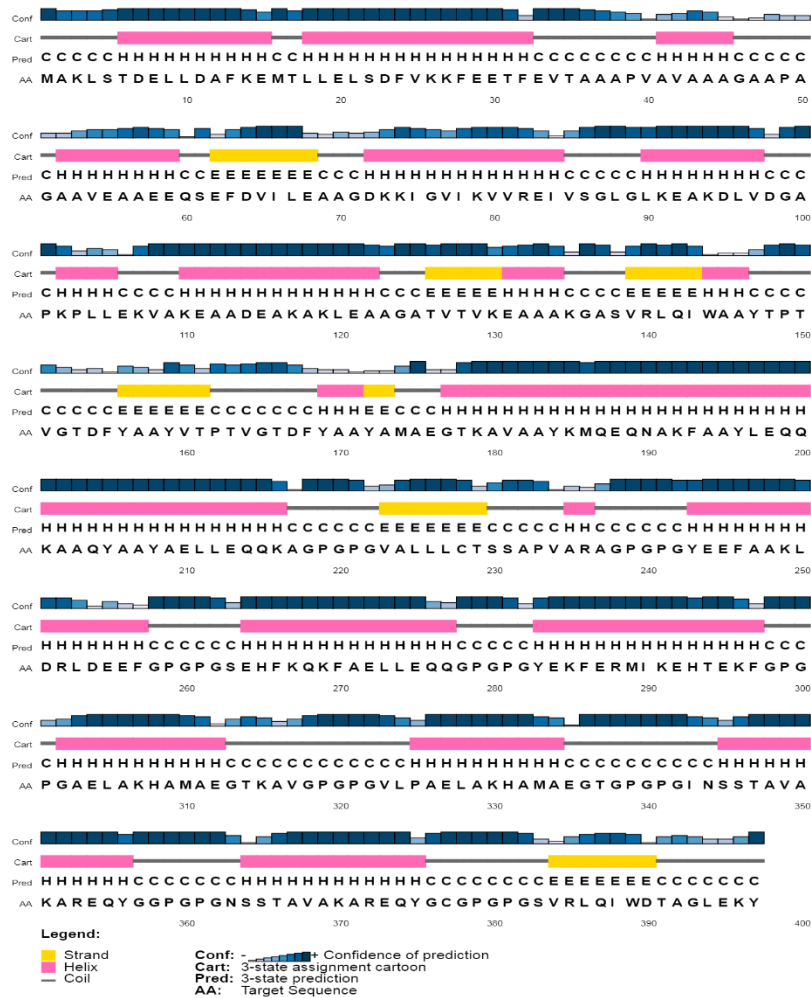
**Molecule type** amino acid

**Query Length** 397

**Other reports** [?](#)

**!** No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

Anexo 9. Representación de la estructura secundaria de la secuencia de múltiples epítomos. Se predice que la proteína está compuesta de hélices alfa (54.66%), hebras beta/strand (9.82%) y espirales/coils (35.52%).



Anexo 10. Puntuación GalaxyRefine de todos los modelos refinados previstos. Se utilizó 1dd3A como la mejor plantilla para modelamiento. La calidad de la estructura se evaluó por el valor P de  $4,20 \times 10^{-5}$ .

Modelo	GDT-HA	RMSD	MolProbability	Clash Score	Poor rotamers	Rama favored
Inicial	10000	0,000	2,363	45	0	96,5
Modelo 1	0,9565	0,408	1,718	8,6	0,4	96,2
Modelo 2	0,9553	0,411	1,757	8,4	1,1	95,9
Modelo 3	0,9616	0,402	1,637	7,3	0,7	96,5
Modelo 4	0,9597	0,4	1,565	6,5	0,7	96,7
Modelo 5	0,9597	0,412	1,696	8	1,1	96,5

Anexo 11. Clasificación de los 10 mejores modelos de acoplamiento multiepítope-TLR2 refinados por FireDock. Los candidatos refinados fueron clasificados por su respectiva energía de enlace, se eligió el modelo final en función de la puntuación de unión

Rank	Solution Number	Global Energy	Attractive VdW	Repulsive VdW	ACE	HB
1	2	-10,03	-10,87	9,81	-0,30	-1,79
2	9	2,04	-1,69	0,32	2,07	-1,26
3	8	2,23	-8,59	0,07	5,74	-1,17
4	1	6,21	-2,82	0	2,05	0
5	5	21,34	-21,02	9,21	16,68	-1,10
6	6	23,37	-16,42	3,59	7,54	-1,71
7	7	111,58	-46,77	182,48	8,05	-5,92
8	3	1240,65	-24,86	1496,41	15,75	-3,09
9	4	2718,03	-33,33	3437,64	13,93	-6,75
10	10	4631,83	-83,47	5916,80	15,11	-8,42

Anexo 12. Clasificación de los 10 mejores modelos de acoplamiento multiepítope-TLR4 refinados por FireDock. Los candidatos refinados fueron clasificados por su respectiva energía de enlace, se eligió el modelo final en función de la puntuación de unión

Rank	Solution Number	Global Energy	Attractive VdW	Repulsive VdW	ACE	HB
1	4	-8,84	-17,05	10,69	3,7	-2,18
2	1	7,77	-23,62	1,98	13,93	-1,8
3	7	10,74	-3,1	0,08	1,44	-1,62
4	8	22,82	-17,76	28,46	5,81	0
5	2	31,21	-32,17	92,71	1,82	-3,59
6	10	674,83	-52,97	896,02	25,17	-6,72
7	6	871,61	-26,79	1118,61	4,66	-4,14
8	5	1153,34	-20,2	1465,8	9,06	-7,82
9	3	1847,74	-30,83	2375,07	-5,62	-2,38
10	9	2490,72	-44,12	3156,41	16,36	-7,38