



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC/SC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO (DINTER)

ROBERTA PASSAMANI AMBROSIO

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS
HIPOTÉTICAS E FUNCIONAIS DE *Leishmania spp.* APLICADOS NO
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTAR E
VISCERAL**

CRICIÚMA/SC
FEVEREIRO, 2019

ROBERTA PASSAMANI AMBROSIO

**PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS
HIPOTÉTICAS E FUNCIONAIS DE *Leishmania spp.* APLICADOS NO
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTAR E
VISCERAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila – UNESC, Criciúma/SC

**CRICIÚMA/SC
FEVEREIRO, 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A496p Ambrosio, Roberta Passamani.
Predição e caracterização de epítomos de proteínas hipotéticas e funcionais de *leishmania spp.* aplicados no diagnóstico sorológico das leishmanioses tegumentar e visceral / Roberta Passamani Ambrosio. – 2019.
84 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.
Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Leishmaniose – Diagnóstico. 2. Bioinformática. 3. Predição de epítomo. 4. Sorodiagnóstico. I. Título.

CDD 23. ed. 616.9364075



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Roberta Passamani Ambrosio**, sob o título **“PREDIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS E FUNCIONAIS DE *Leishmania* spp. APLICADOS NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTAR E VISCERAL”**, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguição a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.

Criciúma, SC, 29 de março de 2019.

Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. JADE DE OLIVEIRA
Membro Interno – UNESC

Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO FERRAZ COELHO
Membro Externo – UFMG

Prof. Dr. AGENOR VALADARES SANTOS
Membro Externo – UFPA

Prof. Dr. Ricardo Andréz Machado de Avila
Orientador

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo a Resolução 07/2015 do PPGCS e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

Dedico esta tese ao meu amor, Claudinei, e a minha querida mãe, Dalva Passamani, que em todos os momentos estiveram ao meu lado apoiando todas as minhas decisões; e aos meus pequenos, Mateus e Miguel, que me dão todo amor que necessito para continuar lutando pelos meus sonhos. Obrigada amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor e orientador Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de concretizar um sonho. Obrigada pela paciência. A todos colegas de laboratório pela acolhida, em especial a Amanda, aluna de iniciação científica que dedicou grande parte do seu tempo a me auxiliar na execução desta tese, e a Bethina pelos ensinamentos e paciência. Aos amigos que fiz em Criciúma, Rahisa e Jonathann, obrigada pelas boas risadas e pelo carinho. Aos colegas de doutorado do DINTER Colatina, em especial aos amigos de todos os momentos Kelly, Wagner e Luciano, obrigada pelo companheirismo e pela parceria. Aos professores do PPGCS pelos ensinamentos e confiança; e aos diretores e coordenadores do UNESC Colatina pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Agradeço em especial à Deus, pela vida, tropeços e vitórias que fizeram de mim alguém melhor com vontade de continuar acertando e errando sempre. E ainda à minha família, meu esposo Claudinei, minha mãe Dalva, meus filhos amados Mateus e Miguel, obrigada pelo carinho, amor e pelo apoio incondicional.

RESUMO

As leishmanioses são um espectro de doenças, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que se apresentam nas formas de Leishmaniose Tegumentar cutânea, mucocutânea ou disseminada; e Leishmaniose Visceral dependendo da espécie do parasita. São um problema de saúde pública em 102 países do mundo, incluindo o Brasil. O controle epidemiológico da doença se faz necessário e o diagnóstico eficaz é uma das medidas profiláticas. No entanto os diagnósticos existentes apresentam limitações, principalmente no que diz respeito a reatividade cruzada com proteínas de outros parasitas. Assim, buscando novos antígenos que diminuam as reações cruzadas no sorodiagnóstico das Leishmanioses, este trabalho teve como objetivo predizer epítomos de linfócitos B e padronizar metodologia de análise *in silico* com a combinação de programas de bioinformática disponíveis na web. Para isto, foram analisadas 12 proteínas de *Leishmania* utilizando o programa Blast-p para avaliar a similaridade com outras proteínas presentes no gênero *Leishmania* e no gênero *Trypanosoma*. Os dados foram exemplificados em duas destas proteínas: Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) com similaridade entre 94% e 98% com proteínas de *Leishmania* e entre 71% e 74% com proteínas de *Trypanosoma*; Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) a similaridade foi entre 92% e 99% com proteínas de *Leishmania* e entre 43% a 53% com proteínas de *Trypanosoma*. Os epítomos lineares preditos pelo programa ABCpred foram 8 para proteína hipotética de *L. infantum* com confiabilidade entre 95% a 86%; e 3 para proteína hipotética de *L. braziliensis*, com confiabilidade de 85%, 88% e 90%. Através do programa IEDB foram obtidos os aminoácidos acessíveis de cada sequência proteica e realizado o alinhamento com o programa Clustal Ômega. A sobreposição dos resultados revelou os aminoácidos ideais para produção de epítomos conformacionais. Das 12 proteínas analisadas duas foram testadas, os epítomos sugeridos foram sintetizados e utilizados como antígeno de cobertura em teste ELISA. Para o peptídeo sintético de *L. infantum* foram testadas as reatividades de soros de cães positivos sintomáticos e positivos assintomáticos para Leishmaniose Visceral, negativos de área endêmica e negativos de área não endêmica, vacinados e portadores de outras doenças como doença de Chagas, Erlichiose e Babesiose. A curva ROC mostra sensibilidade muito próxima a 100% quando foi utilizado peptídeo sintético e de 97% para o antígeno total solúvel de *L. infantum*; com acurácia de 99% e 85% respectivamente. O peptídeo sintético de *L. braziliensis* foi testado frente a soros humanos de pacientes portadores da Leishmaniose Tegumentar cutânea e mucocutânea, pacientes negativos para leishmaniose e portadores de doença de Chagas. O teste ELISA com peptídeo sintético de *L. braziliensis* apresentou 100% de sensibilidade e de especificidade, com AUC de 100%. Utilizando o antígeno solúvel de *L. braziliensis* a sensibilidade do teste foi de 97% e a especificidade diminuiu para 66%, apresentando acurácia de 83%. Portanto, os resultados com os peptídeos sintetizados melhoram a acurácia do teste ELISA diminuindo as reações cruzadas, demonstrando que os procedimentos de bioinformática sugeridos neste trabalho são ferramentas eficazes na construção de epítomos que mimetizam um epítomo conformacional.

Palavras-Chave: Leishmaniose; Bioinformática; Predição de Epítomo; Diagnóstico Sorológico.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a spectrum of diseases, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which present forms Cutaneous Leishmaniasis: cutaneous, muco-cutaneous or disseminated; and Visceral Leishmaniasis depending on the species of the parasite. It is a public health problem in 102 countries around the world, including Brazil. Epidemiological control of the disease is necessary and effective diagnosis is one of the prophylactic measures. However, the existing diagnoses have limitations, mainly regarding the cross reactivity with proteins of other parasites. Thus, in the search for new antigens that reduce cross reactions in the serodiagnosis of Leishmaniasis, this work aimed to predict B lymphocyte epitopes and to standardize in silico analysis methodology with the combination of bioinformatics programs available on the web. For this, 12 *Leishmania* proteins were analyzed using the Blast-p program to evaluate the similarity with other proteins present in the genus *Leishmania* and no genus *Trypanosoma*. The data were exemplified in two of these proteins: Hypothetical Protein of *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) with similarity between 94% and 98% with *Leishmania* proteins and between 71% and 74% with *Trypanosoma* proteins; The hypothesized protein of *Leishmania braziliensis* MHOM / BR / 75 / M2904 (XP_001568689.1) similarity was between 92% and 99% with *Leishmania* proteins and between 43% and 53% with *Trypanosoma* proteins. The linear epitopes predicted by the ABCpred program were 8 for hypothetical protein of *L. infantum* with reliability between 95% and 86%; and 3 for hypothetical *L. braziliensis* protein, with reliability of 85%, 88% and 90%. Through the IEDB program the accessible amino acids of each protein sequence were obtained and performed in alignment with Clustal Omega program. Overlapping the results revealed the ideal amino acids for producing conformational epitopes. The 12 proteins analyzed two were tested, the suggested epitopes were synthesized and used as antigen coverage in the ELISA test. For the synthetic peptide of *L. infantum*, the reactivity of symptomatic positive and asymptomatic positive dog sera for Visceral Leishmaniasis, negative endemic area and negative of non-endemic area, vaccinated and carriers of other diseases such as Chagas disease, Erlichiosis and Babesiosis. The ROC curve shows sensitivity very close to 100% when synthetic peptide was used and 97% for the total soluble antigen of *L. infantum*; with accuracy of 99% and 85% respectively. The synthetic peptide of *L. braziliensis* was tested against human sera from patients with cutaneous cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, negative for leishmaniasis and patients with Chagas' disease. The ELISA with synthetic peptide of *L. braziliensis* presented 100% sensitivity and specificity, with AUC of 100%. Using the soluble antigen of *L. braziliensis* the sensitivity of the test was 97% and the specificity decreased to 66%, presenting an accuracy of 83%. Therefore, the results with the synthesized peptides improve the accuracy of the ELISA test by reducing cross reactions, demonstrating that the bioinformatics procedures suggested in this work are effective tools in the construction of epitopes that mimic a conformational epitope.

Keywords: Leishmaniasis; Bioinformatics; Epitope Prediction; Serological Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo Biológico de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 2 – Vetor e formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i>	15
Figura 3– Áreas de maior concentração de Leishmaniose no Brasil em 2015.....	16
Figura 4– Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Humana.....	18
Figura 5– Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral.....	19
Figura 6– Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	20
Figura 7– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania infantum</i> JPCM5) (XP_001468941.1).....	33
Figura 8– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1).....	33
Figura 9– Analise de similaridade com programa Blast-P da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania infantum</i> JPCM5) (XP_001468941.1).....	34
Figura 10– Analise de similaridade com programa Blast-P da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1).....	35
Figura 11– Alinhamento das proteínas de <i>Leishmania</i> similares feito pelo Clustal Ômega de parte da sequência contendo os epítomos preditos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania infantum</i> JPCM5) (XP_001468941.1).....	37
Figura 12– Alinhamento das proteínas de <i>Trypanosoma</i> similares feito pelo Clustal Ômega de parte da sequência contendo os epítomos preditos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania infantum</i> JPCM5) (XP_001468941.1).....	38
Figura 13– Alinhamento das proteínas de <i>Leishmania</i> similares feito pelo Clustal Ômega de parte da sequência contendo os epítomos preditos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1).....	39
Figura 14– Alinhamento das proteínas de <i>Trypanosoma</i> similares feito pelo Clustal Ômega de parte da sequência contendo os epítomos preditos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1).....	40

Figura 15– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania infantum</i> JPCM5) (XP_001468941.1) com análise combinada dos programas ABCpred e IEDB.....	41
Figura 16– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1) com análise combinada dos programas ABCpred e IEDB.....	42
Figura 17– Gráfico com a reatividade dos soros de cães pelo teste ELISA medida em absorbância (ABS) utilizando o peptídeo de <i>L. infantum</i> e SLA (antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>) como antígenos de cobertura.....	43
Figura 18 – Curva ROC comparando a reatividade de anticorpos presente nos soros dos grupos de cães frente ao peptídeo sintetizado e o SLA.....	45
Figura 19– Gráfico com a reatividade dos soros humanos pelo teste ELISA medida em absorbância (ABS) utilizando o peptídeo de <i>L. braziliensis</i> e SLA (antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>) como antígenos de cobertura.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Principais espécies do gênero <i>Leishmania</i>	11
Tabela 2– Proteínas analisadas.....	32
Tabela 3– Predição dos epítomos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania infantum</i> JPCM5) (XP_001468941.1).....	36
Tabela 4– Predição dos epítomos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1).....	36
Tabela 5– Estatística de comparação entre o peptídeo de <i>L. braziliensis</i> e o extrato frente ao Soro Humano.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCpred – Predição de epítipo de célula B baseado em Rede Neural Artificial
- ABS – Absorbância
- AUC – Acurácia (área sob a curva ROC)
- BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search*
- BLAST-p – do inglês *Protein Basic Local Alignment Search*
- Cut-off* – Ponto de corte
- DCM – Diclorometano
- DMF – Dimetilformamida
- DNA – Ácido Desoxiribonucleico
- DTH – Reação de Hipersensibilidade do tipo Tardia
- EIE – Ensaio Imunoabsorbância enzimática
- ELISA – Ensaio Imunoabsorbância enzimática
- Es – Especificidade
- GenBank - Banco de dados de nucleotídeos público
- gp - Glicoproteína de membrana
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humano
- IEDB –do inglês *Immune Epitope Database and Analyses Resource*
- IT-Leish® – Teste rápido Imunocromatográfico para Leishmaniose Visceral Canina
- k-DNA – DNA do cinetoplasto
- LC – Leishmaniose Cutânea
- LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
- Leish-Tec® – Vacina Recombinante contra Leishmaniose visceral canina

LMC – Leishmaniose Mucosa ou muco-cutânea

LT – Leishmaniose Tegumentar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LTH – Leishmaniose Tegumentar Humana

LV – Leishmaniose Visceral

LV – Leishmaniose Visceral Americana

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MET – Metanol

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*

nPCR – do inglês *Nested-PCR*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação da Polimerase em cadeia

PBS – Solução salina fosfato

PBS-T – Solução salina fosfato Tween

qPCR – PCR quantitativa

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

ROC – do inglês *Receiver Operating Characteristic*

Se– Sensibilidade

SLA – Extrato Solúvel de Leishmania

snPCR – do inglês *Seminested-PCR*

TES – Trietilsilano

TFA – Ácido trifluoracético

WHO – do inglês *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 CONCEITO E ETIMOLOGIA DA LEISHMANIOSE	11
1.2 HISTÓRICO	12
1.3 CICLO EVOLUTIVO DO PARASITA	13
1.4 EPIDEMIOLOGIA	15
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	17
1.5.1 Leishmaniose Tegumentar (LT)	17
1.5.2 Leishmaniose Visceral (LV)	18
1.6 DIAGNÓSTICO	20
1.7 PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE <i>LEISHMANIA</i>	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DAS PROTEÍNAS DE <i>LEISHMANIA</i>	27
3.2 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS DAS PROTEÍNAS DE <i>LEISHMANIA</i>	28
3.3 ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>LEISHMANIA</i>	28
3.4 AMOSTRAS DE SORO DE CÃES	29
3.5 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS	30
3.6 ELISA UTILIZANDO OS ANTÍGENOS DIAGNÓSTICOS	30
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS OBTIDAS ATRAVÉS DO GENBANK	64
ANEXO B – ANÁLISE DE SIMILARIDADE COM OUTRAS PROTEÍNAS DE <i>LEISHMANIA</i> E DE <i>TRYPANOSOMA</i> OBTIDAS PELO BLAST	67
ANEXO C – ANÁLISE COMBINADA DA PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DO ABCPRED COM A SIMILARIDADE OBTIDA PELO BLAST ENTRE AS PROTEÍNAS DE <i>LEISHMANIA</i>	73
ANEXO D – ANÁLISE COMBINADA DA PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS do ABCPRED COM A SIMILARIDADE OBTIDA PELO BLAST ENTRE AS PROTEÍNAS DE <i>TRYPANOSOMA</i>	77
ANEXO E – ANÁLISE COMBINADA ABCPRED X IEDB	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITO E ETIMOLOGIA DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um espectro de doenças causadas por parasitos protozoários da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Rioux et al. 1990). Segundo Lainson e Shaw (1987) o gênero *Leishmania* possui cerca de 20 espécies que infectam mamíferos mostrados na tabela.

Tabela 1– Principais espécies do gênero *Leishmania*. *Espécies determinantes da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.

Espécies causadoras da Leishmaniose Tegumentar (LT)	Espécies causadoras da Leishmaniose Visceral (LV)
<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (Leishmania) chagasi</i>
<i>L. (L.) amazonensis*</i>	<i>L. (L.) donovani</i>
<i>L. (L.) archibaldi</i>	<i>L. (L.) infantum (syn. L. chagasi)</i>
<i>L. (L.) aristidesi</i>	
<i>L. (L.) enriettii</i>	
<i>L. (L.) hertigi</i>	
<i>L. (L.) major</i>	
<i>L. (L.) mexicana</i>	
<i>L. (L.) pifanoi</i>	
<i>L. (L.) tropica</i>	
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	
<i>L. (Viannia) braziliensis*</i>	
<i>L. (V.) colombiensis</i>	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	
<i>L. (V.) lainsoni*</i>	
<i>L. (V.) lindenberg</i>	
<i>L. (V.) panamensis</i>	
<i>L. (V.) peruviana</i>	
<i>L. (V.) naiffi*</i>	
<i>L. (V.) shawi*</i>	

Fonte: Lainson & Shaw (1987).

Tais parasitos são transmitidas através da picada de fêmeas de insetos hematófagos pertencentes à subfamília Phlebotominae, tendo como principal representante na Europa, Ásia e África o gênero *Phlebotomus* e na região Americana o gênero *Lutzomyia* (Ashford, 2000). Duas espécies de vetores estão relacionadas com a transmissão da doença no Brasil o *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora e possui ampla expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: nordeste, norte, sudeste e centro-oeste, o que explica a disseminação do parasita no país (Oliveira et al., 2010).

1.2 HISTÓRICO

A Leishmaniose é considerada uma doença antiga por existirem relatos que se assemelham com as manifestações da doença desde o século XVIII, onde são relatados na Síria o botão d'Aleppo e no Irã o botão de Biskra. As manifestações viscerais do calazar também possuem registros antigos, principalmente na Índia, onde médicos gregos em 1835 relatam a existência de uma esplenomegalia infantil que se assemelha a Leishmaniose Visceral na ilha de Hidra, próximo a Creta (Altamirano-enciso, 2003).

No entanto a primeira descrição das formas amastigotas do parasita ocorreu em 1885 na Índia em casos de calazar. O pesquisador russo Peter Fokitsch Borovsky em 1898 conseguiu pela primeira vez publicar a descrição do etiológico do botão d'Aleppo e botão do Oriente descrevendo este como um protozoário. Porém a referência não foi conhecida no Ocidente, assim, muitos pesquisadores consideram que a descoberta do parasita foi feita em 1903 por James Homer Wright que descreveu a espécie *Leishmania tropica* (Altamirano-enciso, 2003).

Apesar de não existir um consenso sobre a descoberta do parasita, a comunidade científica relata que a partir de 1900 William Leishman, médico inglês, iniciou os estudos das formas amastigotas e em 1903 publicou relatos da semelhança deste protozoário causador do calazar com as formas do *Trypanosoma*. No mesmo ano Charles Donovan, médico inglês, descreveu o parasita; e Laveran e Mesnil denominaram de *Leishmania donovani* o agente etiológico de infecções viscerais na Índia ao examinar alguns preparados de Donovan. Ronald Ross no mesmo ano demonstrou que os parasitos observados por Donovan não eram esporozoários como este havia pensado, e estabeleceu para eles um novo gênero, o *Leishmania* (Rioux et al., 1990; Altamirano-enciso 2003).

No mesmo ano em Boston, J. H. Wright observou formas de protozoários em amostras retiradas das úlceras de uma criança diagnosticadas com a doença Botão do Oriente procedente da Síria e denominou o agente etiológico como *Welcozoma tropicum* ou *Helcosoma tropicum*. Porém, logo após o protozoário foi incluído no gênero *Leishmania*, sendo hoje conhecido como *Leishmania tropica* Wright (Altamirano-enciso, 2003).

As formas evolutivas munidos de flagelos, promastigotas, do gênero *Leishmania* foram relatadas pela primeira vez por Leonard Rogers e no Brasil, por Gaspar de Oliveira Vianna (Altamirano-enciso, 2003).

Nas Américas a forma visceral americana (LVA) foi descrita pela primeira vez no Paraguai, em 1913, e os primeiros casos de LC descritos por Carini e Paranhos, no Sul do Brasil, em 1909. Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença e o pesquisador brasileiro do Instituto Oswaldo Cruz, Gaspar Vianna, nomeou a espécie de *Leishmania braziliensis* (Ministério da Saúde, 2017).

1.3 CICLO EVOLUTIVO DO PARASITA

O ciclo biológico da doença, mostrado na figura 1, inicia-se quando as fêmeas de flebotomíneo (figura 2-A), popularmente conhecido como mosquito palha, realizam o repasto sanguíneo para se alimentar do sangue de hospedeiros mamíferos parasitadas. Desta forma, ingerem células do sistema mononuclear fagocítico contaminadas com a forma amastigota da *Leishmania* (figura 2-C). Tais formas do parasita sendo ingeridas multiplicam no sistema digestório do inseto e se diferenciam na forma promastigota procíclica mostrada na figura 2-B (Ilg, 2001).

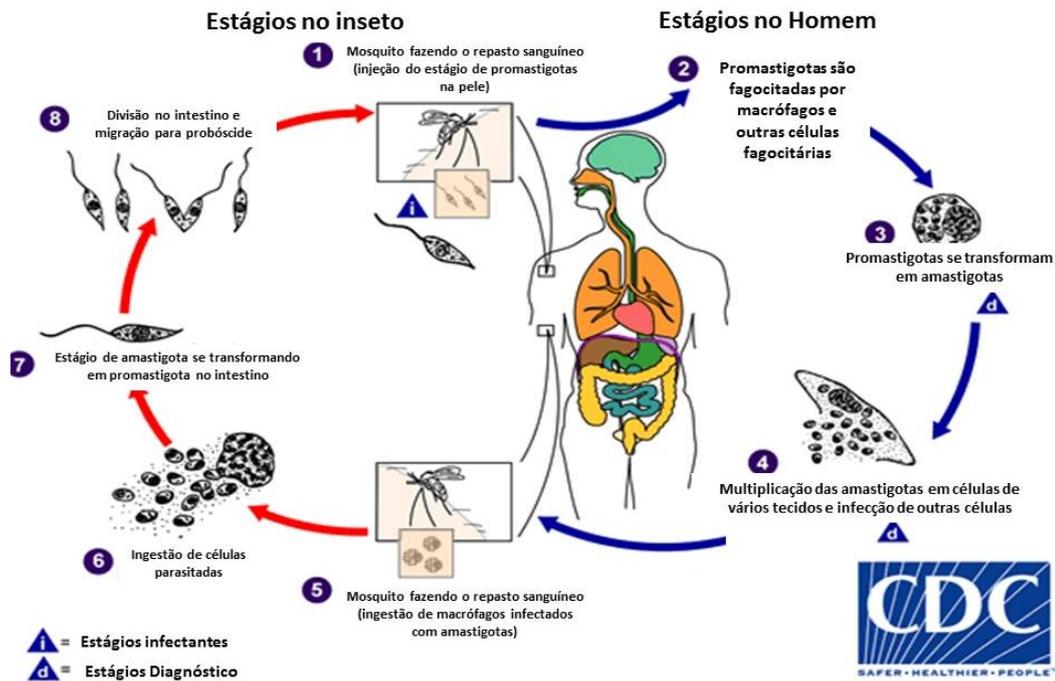


Figura 1– Ciclo Biológico de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: CDC (2018) adaptada.

Em seguida, através da metaciclogênese, as formas extracelulares altamente replicativas e não infecciosas diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, essas, sem capacidade replicativa, mas altamente infecciosas, que são as responsáveis pela infecção do hospedeiro vertebrado. O vetor, agora contaminado, no momento de um novo repasto injeta, junto com sua saliva, algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero (Sacks e Kamhawi, 2001). Os parasitas são, na sua maioria, fagocitados por células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans. Dentro dessas células ocorre a fusão do vacúolo de fagocitose que se fundem a lisossomos, formando os fagolisossomos que originam os vacúolos que propiciam a diferenciação das promastigotas em amastigotas. Essas formas aflageladas são parasitas intracelulares obrigatórios, possuem grande capacidade de multiplicação, alto poder de infecção e são responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero (Grimaldi et al., 1989; Sacks e Kamhawi, 2001).

Alguns mamíferos podem atuar com reservatórios da infecção, sendo responsáveis pela transmissão maciça do parasita para o vetor. O cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção na área urbana e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. Já no ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Ministério da Saúde, 2014).



Figura 2– Vetor e formas evolutivas do gênero *Leishmania*. A- Vetor flebotomíneo popularmente conhecido como mosquito-palha, vetor da leishmaniose. B- Forma promastigota, flagelada e móvel. C- Forma amastigota, aflagelada e imóvel da leishmaniose. Fonte: Ministério da Saúde (2014).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A doença apresenta ampla distribuição geográfica, e segundo a OMS, em 2017 foram notificados 20792 novos casos (WHO, 2018). Sua ocorrência se estende a 102 países e sua distribuição mundial está relacionada principalmente a presença dos vetores em regiões tropicais e subtropical (Ashford, 2000; Santos et al., 2016).

Esta parasitose afeta principalmente pessoas de baixa renda nos continentes Africano, Asiático e na América Latina, e está associada à desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, baixa do sistema imunológico e falta de recursos. Dos 200 países vinculados a OMS 97 são endêmicos para leishmaniose, onde 10 países são endêmicos para LV (Leishmaniose Visceral), 22 são endêmicos para LT (Leishmaniose Tegumentar) e 65 são endêmicos para ambas (WHO, 2018).

Desde 2013, o programa de Leishmaniose Global da OMS vem relatando separadamente o número de novos casos autóctones, para monitorar as tendências de incidência e o número de casos importados. Em 2016, mais de 90% dos casos globais de LV foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. E o maior número de casos de LT reportados em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos respondem por 84% da incidência global relatada (WHO, 2018).

No Brasil, a Leishmaniose inclui-se no quadro das grandes endemias, a LT apresentando ampla distribuição em todas as regiões brasileiras e a LV apresentando-se em limitada a alguns estados do país (Alvar et al., 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2016 foram relatados 12.690 novos casos de LT no Brasil, sendo o norte e nordeste as regiões brasileiras com um número maior de notificações. Em relação a LV foram relatado, neste mesmo ano, 3200 novos casos com taxa de letalidade de 8% a 9% nos últimos 4 anos

(2014, 2015, 2016 e 2017), sendo os óbitos mais frequentes de crianças que possui uma resposta imune ineficiente ao parasita. Os casos de LV também são de maior incidência na região nordeste (e). Os mapas abaixo publicados pelo Ministério da Saúde (figura 3) mostram as áreas de maior concentração da LT no Brasil (figura 3-A) e de LV (figura 3-B) no ano de 2015.

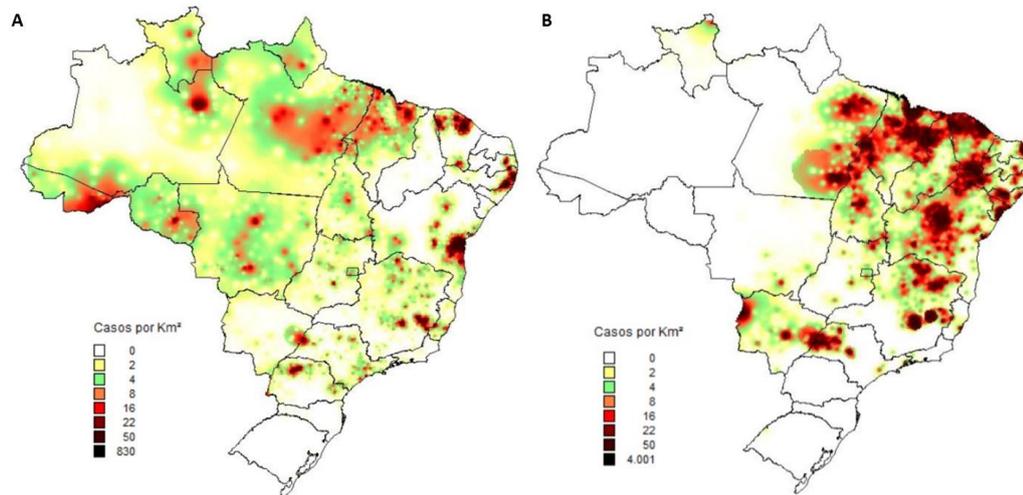


Figura 3– Áreas de maior concentração de Leishmaniose no Brasil em 2015. A- Mapa com as áreas de maior densidade de LT no Brasil no ano de 2015. B- Mapa com as áreas de maior densidade de LV no Brasil no ano de 2015. Fonte: Ministério da Saúde (2018a; 2018b)

No Brasil, apesar da LV humana ser causadora de mortalidade, atualmente a LV canina (LVC) pode ser considerada de maior importância epidemiológica uma vez que o número de casos registrados em cães é significativamente maior em comparação ao número de casos notificados em humanos nas diversas regiões do país (Nicolato et al., 2013). Nas áreas urbanas do Brasil o cão é considerado reservatório da infecção (Coura-Vital et al., 2013; Otranto e Dantas-Torres, 2013). Cerca de 20 a 60% dos animais infectados podem apresentar evolução lenta da LVC, não apresentando sintomas, sendo caracterizados como assintomáticos (Baneth et al., 2008). Laurenti et al. (2013) relata que cães assintomáticos infectados por *L. infantum* possuem elevado potencial infectante para vetores naturais, sendo de grande importância para o controle epidemiológico da doença humana. Essa fase pode durar até quatro anos, mas ainda assim, durante esse período, os mesmos podem permanecer infecciosos, sendo capazes de transmitir os parasitas disseminando a doença (Baneth et al., 2008).

Sendo assim, as leishmanioses são consideradas no Brasil e no mundo um importante problema de saúde pública, onde devem ser adotadas políticas de controle epidemiológico da sua transmissão se fazendo necessário diagnósticos e tratamentos eficientes tanto para infecção humana quanto para infecção canina (Otranto e Dantas-Torres, 2013; Ministério da Saúde, 2016).

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A gravidade da doença nos hospedeiros mamíferos, nos quais se enquadram o homem e o cão, podem variar desde lesões cutâneas simples de cura espontânea a um comprometimento visceral que pode ser fatal quando não tratado corretamente (Santos et al., 2016). Tais manifestações podem ser divididas em dois grandes grupos: Leishmaniose Tegumentar (LT) que se subdivide em Leishmaniose Tegumentar Americana, no Novo Mundo e Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo; e a Leishmaniose Visceral (LV) (Alvar et al., 2012).

1.5.1 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A LT é uma doença causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. A infecção humana pode ser secundária visto que afeta primariamente outros animais. A Leishmaniose Tegumentar pode-se manifestar sobre três formas clínicas principais, mostradas na figura 4, e descritas abaixo:

A Leishmaniose Cutânea (LC) é forma mais comum da doença, tendo desenvolvimento benigno em indivíduos imunocompetentes. Manifesta-se como uma úlcera única bem delimitada com borda elevada e centro granulomatoso seroso (figura 4- A), causada pela resposta inflamatória do hospedeiro a infecção. A ulcera é indolor e normalmente não purulenta, apresenta estas características apenas quando está associada a infecções bacterianas. Pode ter cura espontânea em aproximadamente 18 meses (Alvar et al., 2012; Papadogiannakis e Koutinas, 2015);

A leishmaniose Cutâneo-difusa (LCD) é caracterizada por lesões difusas por regiões do corpo em forma de nódulos não ulcerados devido à metástases do parasita mostradas pela figura 4- B. Normalmente está associada no Brasil a infecção por *L. amazonensis*, sendo mais resistente ao tratamento convencional (Uribe-Restrepo et al. 2018).

Apresenta alta parasitemia e baixa imunidade celular com aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Wortmann et al., 2000; Papadogiannakis e Koutinas, 2015);

A leishmaniose Muco-Cutânea (LMC) promove necrose com destruição do tecido mucoso e submucoso das cavidades nasal e oral, levando a desfiguração (figura 4- C). Normalmente surge após cura espontânea de úlceras anteriores e normalmente está associada no Brasil a infecção por *L. braziliensis* (Alvar et al. 2012). Caracterizada por intensa resposta imune celular com alta de linfócitos T *helper* 1 e baixa manutenção da parasitemia (Grimaldi, Jr. & Tesh, 1993; Papadogiannakis e Koutinas, 2015).

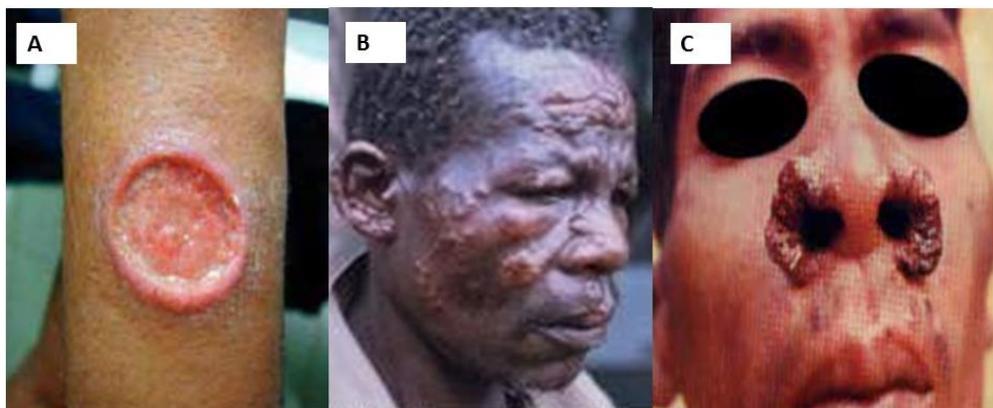


Figura 4– Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Humana. A- Forma cutânea simples da Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Cutânea (LC); B- Forma difusa da Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Cutânea-Difusa (LCD); C- Forma Mucosa da Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Muco-cutânea (LMC). Fonte: Ministério da Saúde (2017).

Na região das Américas 12 espécies de *Leishmania* são dermatrópicas e causadoras de doença tegumentar humana. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2017) foram identificadas 7 espécies causadoras da LT humana, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*. Porém em estados das regiões Norte e Nordeste foram identificadas as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*.

1.5.2 Leishmaniose Visceral (LV)

Já a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar é a forma mais grave da doença por atingir órgãos importantes como baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Dentre os sintomas comuns da doença destacam-se a febre, palidez cutâneo-mucosa por presença de anemia, caquexia e hepatoesplenomegalia com ascite mostrada na figura 5 (Ashford, 2000). Em estágios avançados (figura 5B), caso não seja feito o diagnóstico e tratamento adequado, a

doença pode evoluir com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral, havendo desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), edema dos membros inferiores, hemorragias, icterícia e ascite, levando ao óbito (Ministério da Saúde, 2014). Nesta forma clínica da Leishmaniose geralmente estão envolvidas infecções pelas espécies *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) e *L. donovani* no Velho Mundo e *L. infantum* no Novo Mundo (Nicolato et al., 2013).

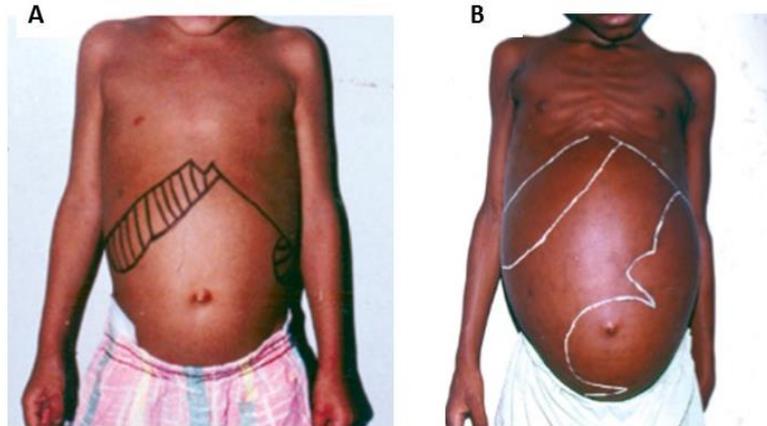


Figura 5– Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral. A- Manifestações clínicas na fase inicial da forma visceral da Leishmaniose Visceral Humana (LV); B- Manifestações clínicas na fase avançada da forma visceral da Leishmaniose Visceral Humana (LV). Fonte: Ministério da Saúde (2014)

Nos cães a LV é de evolução lenta e início insidioso apresentando um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final, havendo distribuição do parasita na derme e nas vísceras. Os sintomas mais comuns, mostrados na figura 6, são: alopecia, lesões cutâneas, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, hemorragia intestinal, hiperqueratose, caquexia, levando o animal a óbito (Ministério da Saúde, 2014).

Porém alguns animais podem apresentar-se assintomáticos durante um longo período, sendo assim, são utilizadas classificações de acordo com os sinais clínicos dos animais:

- Cães assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania* (Nicolato et al., 2013);
- Cães oligossintomáticos: presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelo opaco, sintomas inespecíficos da Leishmaniose Visceral Canina (Nicolato et al., 2013);
- Cães sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas, onicogribose e caquexia (Nicolato et al., 2013).

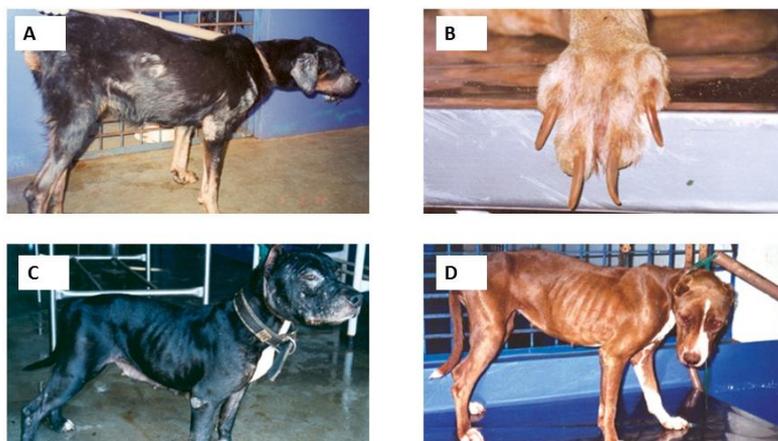


Figura 6– Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). A- Alopecia e lesões da derme de cão com LVC; B- Onicogribose de cão com LVC; C- Lesões de pele na região do focinho de cão com LVC; D- Caquexia em cão com LVC. Fonte: Ministério da Saúde (2014).

1.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das formas da Leishmaniose é realizado por meio de inquéritos clínicos e epidemiológicos, este deve ser associado a testes laboratoriais que podem ser parasitológicos (diagnóstico de certeza) ou sorológicos. Os aspectos clínicos muitas vezes não são suficientes por apresentarem sintomatologias variadas de acordo com a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro (Ministério da Saúde, 2017).

Por outro lado, o diagnóstico parasitológico é uma alternativa que apresenta alta especificidade, uma vez que demonstra a presença do parasito pela visualização das formas amastigotas em materiais de biópsia ou a amplificação do DNA do parasito por PCR; ainda pode ser realizado o cultivo em meios de cultura ou inoculação das biópsias em animais de laboratório susceptíveis. Sendo assim a observação do parasita ou a detecção do seu DNA é considerado diagnóstico de certeza da infecção (Weigle et al., 2002; Lunedo et al., 2012).

Para diagnóstico da LV os métodos parasitológicos são considerados como padrão de referência devido à sua alta especificidade. Para realização do método parasitológico é necessária coleta do material que pode ser obtido por raspagem, punção aspirativa com agulha fina ou biópsia de lesões. No entanto sua sensibilidade varia dependendo da localização geográfica, espécie do parasita e estágio da lesão. Para melhorar sua sensibilidade normalmente são associados múltiplos testes diagnósticos parasitológicos ou diagnósticos imunológicos (WHO, 2010; Ministério da Saúde, 2014).

Para realização do método parasitológico no diagnóstico da LV é necessária coleta das células teciduais, e a sua sensibilidade depende do tecido em que se realiza a coleta. A

punção do baço segundo dados da WHO (2010) para diagnóstico da LV apresenta acima de 90% de sensibilidade, já na medula óssea de 50-80% de sensibilidade, e é ainda menor em aspirados de linfonodo. Amostras de sangue têm baixa sensibilidade tanto para LV, exceto em pacientes co-infectados pelo HIV que têm uma parasitemia mais alta (WHO, 2010). Os aspirados esplênicos apesar da elevada especificidade para LV apresentam risco de hemorragia de 0,1 %, sendo considerado extremamente invasivo (WHO, 2010; Burza et al., 2018). Além disso, apesar de maior especificidade as técnicas parasitológicas apresentam limitações em sua sensibilidade, devido à distribuição do parasito não ser homogênea nos tecidos (Noli e Saridomichelakis, 2014).

A partir da coleta do material pode ser feita a observação microscópica do parasita, através do esfregaço onde normalmente são utilizadas as técnicas de coloração por Geimsa, Leishman ou corantes rápidos. É o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. Porém tem limitações e a sensibilidade pode variar de acordo com a experiência do microscopista, a observação e confecção de mais lâminas, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (WHO, 2010; Ministério da Saúde, 2017).

Segundo revisão feita por de Paiva-Cavalcanti et al (2015) a técnica de PCR pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico. A sensibilidade pode variar de acordo com o tipo de PCR, como *Nested-PCR* (nPCR) e a *Seminested-PCR* (snPCR) que são baseadas em duas amplificações, sendo realizada uma segunda amplificação a partir de uma primeira PCR, aumentando assim a sensibilidade e especificidade; outro tipo é o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) que quantifica a reação e tem sido empregado para confirmação de outros testes de diagnóstico ou para confirmação de cura. Tais metodologias dão ao PCR mais ferramentas usando diferentes regiões-alvo e uma variedade de amostras. Nos protocolos convencionais de PCR para o diagnóstico de LV humana existe uma variação de 53,70% a 97,78% de sensibilidade e 61,82% a 100% de especificidade, e para LV canina sensibilidade de 72,2 a 98,7% e especificidade de 83,3% a 96,4%. Esta variabilidade ocorre devido a amostra coletada, a espécie de *Leishmania* envolvida, ao estágio da doença e a metodologia empregada (De Paiva-Cavalcanti et al., 2015). Porém, tais técnicas possuem outras desvantagens que estão relacionadas ao seu custo elevado, à necessidade de infraestrutura laboratorial especializada e ao risco de contaminação durante a realização dos exames. Portanto atualmente só estão disponíveis em laboratórios de instituições de pesquisa e, se houver indicação para a sua realização, o laboratório de referência mais próximo deve ser consultado (Ministério da Saúde, 2017).

Uma alternativa que pode ser utilizada são os testes de sensibilidade sendo a intradermoreação de Montenegro a técnica descrita para o diagnóstico das Leishmanioses. Neste tipo de diagnóstico são injetados antígenos do parasita e avaliada a reação de hipersensibilidade tardia (DTH), onde se houver uma reação com diâmetro igual ou maior que 5mm em 48h à 72h o teste é considerado positivo (Burza et al. 2018). Porém se limita ao diagnóstico de algumas formas de Leishmaniose, sendo mais utilizada para LT na forma cutânea e na forma muco-cutânea, já que casos de LT disseminada e LV apresenta-se negativa devido ao estado de anergia da resposta imune celular encontrada na maioria dos pacientes (Ministério da Saúde, 2014; 2017).

Por sua vez, os testes de diagnóstico sorológico têm sido amplamente empregados por serem considerados de fácil execução, baixo custo e não necessitar de grande infraestrutura laboratorial e equipamentos de custo elevado, além de serem pouco invasivos (Noli e Saridomichelakis, 2014). Técnicas baseadas na detecção de anticorpos, como aglutinação direta, RIFI (Reação de imunofluorescência indireta) e o ELISA (Ensaio Enzimático de Imunoabsorbância), podem ser consideradas ferramentas importantes para o diagnóstico da Leishmaniose e monitoramento da exposição dos indivíduos em áreas endêmicas da doença. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2014), os testes imunológicos mais utilizados, tanto para LV quanto para LT, são ELISA e RIFI, considerando os testes rápidos imunocromatográficos como uma alternativa de triagem. Geralmente, tais testes utilizam antígenos obtidos de frações brutas e/ou moléculas semi-purificadas do parasito, bem como proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos (Sarkari et al., 2018).

Em uma revisão Sarkari et al. (2018) relata que a aglutinação direta se apresenta com especificidade variável entre 72% - 100% e com sensibilidade de 92% - 100%, e que diversos trabalhos constatam que a aglutinação tradicional é mais sensível e mais específica que o teste rápido com fita usando o antígeno rK39. Também em um trabalho de Oliveira et al. (2013), 103 soros de pacientes com LV no Brasil foram submetidos aos testes de aglutinação direta tradicional e aglutinação direta de antígeno liofilizado de *L. infantum* que demonstraram semelhanças na sensibilidade (99%) e na especificidade (98,2%). A aglutinação direta apresenta algumas desvantagens e sua variabilidade pode estar relacionada as múltiplas pipetagens, longo tempo de incubação, variabilidade de lote para lote do antígeno e reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos (Sarkari et al., 2018).

Já o RIFI (Reação de imunofluorescência indireta) baseia-se na detecção de anticorpos contra formas promastigotas ou amastigotas do parasita. Segundo Sarkari et al. (2018) vários estudos mostraram uma sensibilidade de 87% a 100% e especificidade de 77% a

100% para o diagnóstico de LV utilizando o RIFI. Porém o teste apresenta reatividade cruzada em pacientes com tuberculose, toxoplasmose, malária, febre tifoide ou brucelose.

Inúmeros testes rápidos têm sido desenvolvidos para facilitar a execução e tornar mais rápido o diagnóstico, a maioria deles utiliza a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* contra proteínas recombinantes, como o rK39 e o K26, fixadas em papel de nitrocelulose. Em um trabalho de validação do teste imunocromatográfico IT-LEISH® (DiaMed IT-LEISH®) para diagnóstico de LV humana o kit apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 97% (Assis et al., 2008). Mesmo quando combinações antigênicas são usadas, há a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, sendo então indicado a aplicação de um procedimento confirmativo (Sarkari et al., 2018). Também são observadas variações dos testes rápidos quando aplicados em regiões endêmicas diferentes, a sensibilidade do Kit rápido utilizando antígeno rK39 na Índia foi excelente (97%) mas apresentou-se muito menor e limitado no leste da África (85%), tais limitações e variações podem estar relacionadas a baixa produção de anticorpos por parte da população (Boelaert et al., 2014).

Por fim os testes ELISA, que também se baseia na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* contra antígenos variados, sua especificidade e sensibilidade variam de acordo com os antígenos utilizados. Neste contexto, vários antígenos com diferentes pesos moleculares foram identificados como a proteína recombinante de *Leishmania* K39 (rK39), muito importante antígeno amplamente empregado, mostrou 100% de especificidade e sensibilidade de 96% para o diagnóstico de LV segundo revisão feita por de Paiva-Cavalcanti (2018). Outros candidatos para o diagnóstico das outras formas de leishmaniose são glicoproteínas recombinantes ou purificadas de membrana (gp): gp63, gp70 e gp72, e a proteína A2, todas específicas para o gênero *Leishmania* (Ministério da Saúde, 2014).

Assis et al. (2008) mostrou que as técnicas de ELISA que utilizam antígenos diferentes apresentam diferença significativa quanto a sensibilidade, onde o teste ELISA utilizando rK39 apresentou 97% de sensibilidade e o teste ELISA com antígeno total de *L. chagasi* 92% de sensibilidade. Porém não houve diferença quanto a especificidade dos dois testes (em torno de 84%), propondo que a metodologia pode gerar falsos positivos com outras doenças causadas por outros tripanosomatídeos.

Entretanto o teste ELISA, assim como outros sorológicos, pode apresentar problemas quando o paciente apresenta baixa produção de anticorpos, prejudicando a sensibilidade das metodologias. Além disso, alguns antígenos utilizados no sorodiagnóstico

podem ser reconhecidos por anticorpos produzidos em pacientes com outras patologias, tais como Doença de Chagas, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Esquistossomose, Hanseníase e Tuberculose; causando reação cruzada nos ensaios e comprometendo a especificidade dos testes empregados (Cataldo et al., 2010).

Para o diagnóstico da LV canina os testes sorológicos apresentam limitações semelhantes (Hirschmann et al., 2015). De Arruda et al. (2013) analisou 1.425 amostras de soro de cães testados em três laboratórios utilizando 2 Kits diagnóstico do tipo ELISA, um com antígenos de *L. major* que apresentou sensibilidade de 91,84% e especificidade de 83,57%; e outro com antígenos de *L. infantum* que apresentou sensibilidade de 89,80% e especificidade de 82,59%, tais resultados demonstram além de baixa sensibilidade os testes diagnósticos de LV canina possuem baixa especificidade, gerando diagnósticos falso negativos.

Tais metodologia para LV canina apresentam sensibilidade e/ou especificidade variáveis principalmente nos diferentes estágios da doença no animal, sendo assim animais infectados na fase inicial da infecção podem se apresentar soronegativos e outros, mesmo clinicamente curados, podem permanecer soropositivos por longos períodos de tempo (Viol et al., 2012; Hirschmann et al., 2015). Ressalta-se também que a especificidade dos testes é comprometida, principalmente, quando os mesmos são aplicados em áreas endêmicas da doença; em animais sadios, mas vacinados; e em cães infectados com outras parasitoses, também comuns em nosso meio como, por exemplo, Babesiose e Erlichiose (Chávez-Fumagalli et al., 2013; Costa et al., 2014). Dessa forma, ainda não se encontra disponível um teste sorológico que possa ser considerado como um padrão-ouro; que permita a distinção dos casos de LV canina sintomática e assintomática, das demais classes de animais e que esteja disponível a um baixo custo à população. Sendo assim, de acordo com o Ministério da Saúde (2014) devem ser realizados dois testes sorológicos, Teste Rápido Imunocromatográfico e ELISA, para confirmar o diagnóstico da doença.

Portanto, o diagnóstico das diversas formas de Leishmaniose, tanto humana como canina, apresentam-se falhos em diversos pontos. Sendo assim, indivíduos com a forma mucocutânea de LTH ou com a forma visceral LV, manifestações mais graves da doença podem não ser tratados da forma mais adequada ou em tempo hábil, devido à inexistência de uma ferramenta diagnóstica confiável (Goto e Lindoso, 2010). Tais fatores limitam a eficácia terapêutica dessas importantes patologias ocorrentes no Brasil. Além da falha no controle da população canina infectada que torna ineficiente as medidas de controle epidemiológico da doença (Laurenti et al., 2013).

Assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de buscar um antígeno que possa ser utilizado dando mais confiabilidade aos testes sorológicos, tornando o diagnóstico mais sensível e específico para as diversas formas da Leishmaniose. Uma alternativa é a caracterização e identificação de epítomos de proteínas expressas pelo parasita utilizando a bioinformática como ferramenta.

Vários trabalhos têm demonstrado que as avaliações genômicas aliadas as produções de peptídeos *in silico* são importantes para busca de proteínas no uso de diagnóstico ou de vacinas mais eficientes que os existentes hoje (Coelho et al., 2012; Costa et al., 2014; Lage et al., 2016b; 2016a).

1.7 PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE *LEISHMANIA*

Sendo assim, proteínas hipotéticas, que previamente são reveladas no genoma de organismos, mas que ainda não apresentam uma aplicação biológica definida podem ser uma alternativa relevante na busca de novas proteínas usadas nos imunodiagnósticos (Coelho et al., 2012; Lage et al., 2016a). Algumas destas proteínas foram identificadas através de análises imunoproteômicas baseadas na combinação das técnicas de eletroforese bidimensional, immunoblotting e espectrometria de massas, utilizando formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e formas amastigotas-like de *Leishmania infantum* e *L. braziliensis* (Coelho et al., 2012). Este trabalho revelou que tais proteínas hipotéticas possuem um potencial antigênico, já que são reconhecidas por anticorpos presentes em amostras de soros de cães com LV sintomática e/ou assintomáticos. Em outro trabalho do mesmo grupo foram observadas que tais proteínas também apresentavam reatividade frente a soros de pacientes com LTH (Duarte et al., 2017). Algumas dessas proteínas são encontradas também em outras espécies de tripanossomatídeos, tais como *Trypanosoma cruzi*; enquanto outras são consideradas como *Leishmania*-específicas.

Portanto o uso de ferramentas como a genômica, a proteômica e a bioinformática tem se tornado cada vez mais frequente. A abordagem computacional usando bioinformática tem sido realizada tanto para rastrear alvos biológicos no tratamento da Leishmaniose, como para identificar marcadores antigênicos importantes no desenvolvimento de vacinas e de kits diagnósticos (Duarte et al., 2017; Ferreira e Andricopulo, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma metodologia de predição por bioinformática de epítomos específicos para linfócitos B de proteínas de espécies de *Leishmania* que possam ser utilizadas em sorodiagnóstico da Leishmaniose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as similaridades da estrutura primária de uma proteína de *Leishmania* com outras proteínas de outras espécies de *Leishmania* e com proteínas das espécies do gênero *Trypanosoma*, utilizando o algoritmo Blast-p (protein-protein BLAST) e o programa Clustal Ômega para alinhar as sequências.
- Predizer os epítomos específicos de células B das proteínas analisadas de *Leishmania* utilizando algoritmos de bioinformática disponíveis no site do IEDB e através do programa ABCpred.
- Sintetizar pela técnica de Fmoc-sínteses as sequências peptídicas preditas como epítomos de duas proteínas analisadas por bioinformática.
- Avaliar a reatividade de anticorpos específicos de amostras de soro da espécie *L. infantum* e *L. braziliensis* utilizando os peptídeos sintéticos preditos como antígenos.
- Avaliar a reação cruzada dos peptídeos preditos utilizados como antígenos frente anticorpos de *Trypanosoma* através da reatividade de soros de cães infectados com o parasita e pacientes portadores de Doença de Chagas.
- Definir parâmetros de sensibilidade e especificidade (acurácia) dos peptídeos sintetizados através da análise estatística da curva ROC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo realizou testes de similaridade e a predição de epítomos específicos de células B por meio de bioinformática de 12 proteínas, 6 proteínas hipotéticas e 6 proteínas com função conhecida, de *Leishmania*, tanto de espécies causadoras da LV quanto de espécies causadoras de LT. Sendo assim foram identificadas possíveis sequências de alta similaridade entre as espécies de *Leishmania* e de pouca similaridade com outros Trypanossomatídeos, que seriam candidatos eficientes para uso em imunodiagnósticos, evitando assim reações cruzadas com outras doenças. Duas proteínas foram utilizadas para validação da metodologia de predição de epítomos, sendo assim, um epítomo de cada foi sintetizado e testado em ensaios de imunodiagnóstico frente a soro de cães e soros humanos.

3.1 PREDIÇÃO DE EPITOPOS DAS PROTEÍNAS DE *LEISHMANIA*

Através de análises *in silico*, as proteínas previamente identificadas por Coelho et al. (2012) foram preditas. Para obter as sequências peptídicas de cada proteína testada foi feita a busca utilizando o nome da proteína no banco de dados online GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Em seguida, utilizou-se o programa de bioinformática Blast-p (*protein-protein BLAST*), pertencente ao programa BLAST para comparação de similaridades entre sequências proteicas, para avaliar a similaridade das proteínas com as demais proteínas depositadas no banco de dados. Para isso, colocou-se a sequência de aminoácidos obtida no GenBank para cada proteína analisada, utilizando o parâmetro *non-redundant protein sequences*, obtendo-se então as sequências com maiores similaridades. Após a busca foram selecionadas as proteínas de *Leishmania* e *Trypanosoma* com maior similaridade.

As sequências das proteínas de *Leishmania* analisadas foram submetidas ao programa ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) capaz de prever epítomos lineares de célula B baseando-se em padrões de comprimento fixo através de uma rede neural artificial (Saha e Raghava, 2006). Neste programa foram utilizados os seguintes parâmetros: *Threshold*: 0.85; *Window length used for prediction*: 14 ou 16; *Overlapping filter*: ON. Foi realizada a predição dos possíveis epítomos para cada uma das 12 proteínas analisadas.

Ao prever os possíveis epítomos das proteínas as sequências proteicas foram alinhadas através do programa Clustal Ômega. Este programa faz o alinhamento de

múltiplas sequências, sendo assim as proteínas de *Leishmania* foram alinhadas e analisadas a similaridade com outras proteínas do mesmo gênero do parasita e com proteínas do gênero *Trypanosoma* identificadas no Blast-P. Assim pode-se comparar as regiões epitópicas das sequências analisadas com as sequências similares obtidas através do Blast-p, tanto com as proteínas de *Leishmania* quanto as de proteínas de *Trypanosoma*.

Para confirmação da predição dos possíveis epítopos também foi utilizado o programa de bioinformática IEDB (www.iedb.org) descrito por Emini et al. (1985). Este programa possui uma série de algoritmos voltados para predição de epítopos de células B e de Células T. Utilizou-se, o algoritmo *Emini Surface Accessibility Prediction*, que identifica na sequência da proteína, os resíduos de aminoácidos mais acessíveis ao solvente, sendo assim os aminoácidos que possivelmente possam ser reconhecidos por anticorpos (Emini et al., 1985).

3.2 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS DAS PROTEÍNAS DE *LEISHMANIA*

Alguns dos peptídeos preditos foram sintetizados utilizando a técnica química de Fmoc-Synthesis descrita por Merrifield (1969) e adaptada por Machado-de-Ávila et al. (2011). O método consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel (resina) e alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Para isso, é feita a desproteção do grupamento Fmoc (Fluorenil-metiloxicarbonila) com Piperidina 25%, lavagem com DMF (dimetilforamida), DCM (diclorometano), MET (metanol), teste de Kaiser (azul de bromofenol), ligação do aminoácido em ciclo realizada até a ligação do último aminoácido da sequência. Ao final os grupamentos protetores da cadeia lateral são eliminados e o peptídeo é removido da resina através da solução de clivagem contendo 25 µL (25%) de água destilada, 25 µL (25%) de TES (trietilsilano), 950 µL (95%) de TFA (ácido trifluoracético). Esta solução foi incubada por 3 horas na seringa, logo após adicionado éter etílico e incubado overnight. No dia seguinte, centrifugou-se a 4°C, por 10 minutos a 4500 rpm, adicionou-se éter etílico novamente e a centrifugação foi repetida. Retirou-se novamente o éter etílico, o material obtido foi liofilizado.

3.3 ANTÍGENO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA*

As amostras para produção dos antígenos a partir dos parasitas MHOM/BR/1970/BH46 de *L. infantum* e MHOM/BR/75/M2903 *L. braziliensis* utilizados no teste ELISA foram produzidas pelo grupo do professor Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e gentilmente cedido para esse trabalho. Para tal, o cultivo e a obtenção das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento dos parasitas foram realizados de acordo com o protocolo descrito em Coelho et al. (2003).

Para a preparação do extrato solúvel de antígenos de *Leishmania* (SLA) foram lavados 1×10^{10} parasitas por três vezes com tampão fosfato-salina (PBS) estéril gelado. Após 7 ciclos de congelamentos (-196°C) e descongelamentos (37°C) foi submetido a ultrasonicação (*Ultrasonic processor*, GEX600) com 5 ciclo de 30 segundos a 38 MHz, a suspensão foi centrifugada a $8000 \times g$ por 30 min a 4°C , e foi coletado o sobrenadante contendo SLA. A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford alíquotado e armazenado a -80°C para posterior utilização.

3.4 AMOSTRAS DE SORO DE CÃES

Todas as amostras de soros, pertencem a soroteca do laboratório coordenado pelo professor Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram também gentilmente cedidas para este trabalho. Foram utilizadas, amostras de soros de cães sem raça definida e infectados com *L. infantum*. Os soros de animais com LVC foram identificados com base em dois testes sorológicos usando os kits RIFI- LVC e EIE-LVC, ambos da Biomanguinhos, Fiocruz, Brasil; para *Leishmania spp.* Animais com um título de RIFI $< 1/40$ ou com o valor de EIE-LVC abaixo do ponto de corte foram considerados soronegativos. Animais com um título de RIFI $> 1/40$ e um valor de EIE-LVC acima do ponto de corte foram considerados soropositivos.

Assim, foram considerados cães sintomáticos ($n=45$) aqueles que se apresentaram positivos para RIFI e ELISA, com exame parasitológico positivo identificado pela técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia) e apresentando três ou mais dos seguintes sintomas clínicos: perda de peso, alopecia, adenopatia, onicogribose, hepatomegalia, conjuntivite e dermatite esfoliativa nas pontas do nariz, cauda e orelha.

Cães com LV assintomática ($n=09$) são os que apresentaram resultados sorológicos e parasitológicos positivos, mas ausência de sinais e sintomas clínicos.

Cães sadios e sem leishmaniose, com resultados sorológicos e parasitológicos negativos e ausência de qualquer sinal ou sintoma clínico de leishmaniose, foram

identificados como controle negativo de área endêmica de LVC quando provenientes de Belo Horizonte, MG- Brasil, (n=20) e controle negativo de área não endêmica (n=50) provenientes de outras localidades.

Amostras de soros de cães imunizados com a vacina Leish-Tec[®] (n=30), e de cães infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* (n=10) ou naturalmente com *Babesia canis* (n=10) e *Erlichia canis* (n=10), serão também utilizadas

3.5 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

Foram utilizadas amostras de soros de pacientes com LTH com diferentes manifestações clínicas, cutânea (LC) (n= 15) e muco-cutânea (LMC) (n= 20). Estes soros foram selecionados a partir de pacientes que apresentavam características epidemiológicas e clínicas para Leishmaniose Tegumentar, além disso foi feito o diagnóstico parasitológico com a observação dos parasitos em esfregaços corados por Giemsa a partir de biópsias cutâneas ou mucosas e por meio de resultados positivos de PCR para o kDNA de *L. braziliensis*. Como controle negativo foram utilizadas 20 amostras de soros de indivíduos saudáveis, que não apresentaram sinais clínicos ou sintomas de leishmaniose. Para avaliar a reação cruzada entre os diversos antígenos, amostras de soros de pacientes com doença de Chagas (n = 10), a infecção pelo *T. cruzi* foi confirmada por hemocultura, utilizando o kit ELISA recombinante Chagatest[®] v.4.0; A soroteca humana foi cedida pelo prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho do Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, da Universidade Federal de Minas Gerais. Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3.6 ELISA UTILIZANDO OS ANTÍGENOS DIAGNÓSTICOS

Foi realizada curva titulação previa para determinar as concentrações de antígenos e a diluição dos anticorpos a serem utilizados. Placas flexíveis de imunoenensaio de microtítulos Falcon (Becton Dickinson) foram revestidas com o peptídeo sintetizado (20 µg/poço) em 50 µL de água milli-Q mantidos por 18h a 37°C ou revestidas com SLA (2,0 µg/poço) em 100 µL de tampão de cobertura pH 9.6 por 18 h a 4°C.

Após a sensibilização, foi realizado bloqueio utilizando 200 µL de solução contendo PBS, Tween 20 0,05% (PBS-T) e 5% de solução de caseína por 1 h a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas por 5 vezes utilizando PBS-T, e feita incubação com 100 µL de soro canino por 1 h a 37°C. As amostras de soro foram diluídas 1:100 para placa com

peptídeo e 1:200 para a placa com SLA em PBS-T contendo 0,5% de solução de caseína. As placas foram lavadas 7 vezes utilizando PBS-T, e posteriormente incubadas com anticorpo anti-IgG canino conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, USA) na diluição de 1:10000 por 1 h a 37°C. Novamente as placas foram lavadas 7 vezes com PBS-T, feita incubação com H₂O₂, orto-phenylenediamine e tampão citrate-fosfato pH 5.0 por 30 min no escuro. A reação foi parada adicionando 25µL H₂SO₄ 2N, e a densidade óptica lida em espectrofotômetro para microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) a 492 nm.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A partir dos valores obtidos nos testes ELISA de absorbância (ABS) foram gerados os pontos de corte (*cut-off*). Para obtenção do valor de *cut-off* utilizou-se a fórmula: média dos valores negativos + 2,5 x desvio médio.

Estes valores de *cut-off* foram utilizados para validação da sensibilidade e especificidade dos antígenos que foram determinados após a construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Nesta etapa para análise do desempenho da ELISA, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Sensibilidade (Se) = valores verdadeiros positivos / total de positivos (verdadeiros positivos + falsos negativos);
- Especificidade (Es) = valores verdadeiros negativos / total de negativos (falsos positivos + verdadeiros negativos);
- Acurácia (AUC) = área sob a curva (verdadeiro positivo + verdadeiro negativo / Positivos + negativos).

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional GraphPad Prism™ (versão 6.0 for Windows).

4 RESULTADOS

Foram analisadas 12 proteínas por meio de programas de Bioinformática descritas anteriormente no trabalho de Coelho et al. (2012) e Duarte et al. (2017) como imunoreagentes que possuem um potencial para serem utilizadas como imunobiológicos.

Tabela 2– Proteínas analisadas. Número de acesso no NCBI, nome /função e espécie/cepa do parasita de onde a proteína foi extraída e identificada. *Seis proteínas hipotéticas.

Número de acesso no NCBI	Nome/função da proteína	Espécie e cepa do parasita
XP_003873146.1*	HYPOTHETICAL PROTEIN	<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103
XP_001464059.1*	HYPOTHETICAL PROTEIN	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_001466606.1*	HYPOTHETICAL PROTEIN	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_001468460.1	PUTATIVE TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1- BETA	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_001468941.1*	HYPOTHETICAL PROTEIN	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_001562623.1	ENDONUCLEASE III	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904
XP_001466177.1	GTP-BINDINGPROTEIN	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_001568689.1*	HYPOTHETICAL PROTEIN	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904
XP_001465979.1	IGE-DEPENDENT HISTAMINE-RELEASING FACTOR	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_001468164.1	BETA-TUBULIN	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_001468360.1*	HYPOTHETICAL PROTEIN	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5
XP_003873457.1	PUTATIVE SMALL MYRISTOYLATED PROTEIN-3	<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103

A tabela 2 mostra as 12 proteínas analisadas com seus respectivos dados de acordo com o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; acessado em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins>), destas, 6 são proteínas descritas no gênero *Leishmania* com função conhecida e 6 proteínas hipotéticas com função desconhecida. Todos os resultados das análises estão presentes nos Anexos A, B, C, D e E; e para demonstrá-los foram escolhidas duas proteínas: Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) e Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1).

Tais proteínas de *Leishmania* foram lançadas no programa GenBank e obtidas suas respectivas sequências de aminoácidos, como demonstrado na figura 7 a sequência de aminoácidos da Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) e na figura 8 a sequência de aminoácidos da Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1). As demais sequências de aminoácidos das 10 proteínas analisadas estão no Anexo A.

```

1 MSIVSRFIGG AKHLLKGGSM KYLAAGEPYC PFGEAFGLTI LPEYILEDDE SNLRKGYVDV
61 YTRASDRIIL NDGRFQLPPL PPASFMPLE RLEQDNVVPK NWLNNQTANL YEPGDFIRAH
121 IDNLFVYDDI FAICSLGSNC LLRFVHVQNG EELDVMVPDR SVYIMSGPAR YVYFHMVLPV
181 EAQRFSLVFR RSIMESDGGF RPVKTPFKEI MPYRATQILN ALYSKQVGGV RVSVDDEFLE
241 SANIGAFDTS RWVKRLHPLR DWSLLRQLDE DEARVEELRE KRFIDVDFSW RYRELSYYK
301 AMEESLVSPH VAHVTPQA

```

Figura 7– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania infantum* JPCM5) (XP_001468941.1).

```

1 MGFLGFGSDS SESYSLSDNS SKVDDRIKLT YAETVVS LAT AFGLVIIVLL DLYRSTFRH
61 AMLLRVQRET RFDGAYILGK PEGSRARIIL ENGLKTHAFR ISDPPQYSRV VPAVVSERD
121 AKKDCVEMLS KVRTILAKSY GRCAELMSMR CCLACVTGAL PAEQSERFLR IYERVMFCSH
181 RVNGDEKLVT SDDIRYMhaf FYNNVLKVLQ

```

Figura 8– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1).

Para as análises de similaridade, as sequências de aminoácidos foram adicionadas no programa Blast e utilizou-se o algoritmo Blast-p (*protein-protein BLAST*) com parâmetro *non-redundante*, obtendo assim as proteínas mais similares depositadas em de banco de dados. A figura 9 mostra a similaridade da Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) (retângulo verde) com outras proteínas do gênero *Leishmania* presentes no banco de dados (retângulo azul). Tais proteínas apresentaram similaridade com a proteína hipotética de *L. infatum* entre 94% e 98%.

<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]	656	656	100%	0.0	100%	XP_001468941.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	647	647	100%	0.0	98%	XP_003722521.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	634	634	100%	0.0	96%	XP_003879124.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	630	630	100%	0.0	94%	XP_001568230.1
<input checked="" type="checkbox"/>	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, putative [Leishmania panamensis]	628	628	100%	0.0	94%	XP_010702541.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein, conserved [Leishmania guyanensis]	625	625	100%	0.0	94%	CCM18890.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein ABL78_4032 [Leptomonas seymouri]	573	573	100%	0.0	84%	KPI86898.1
<input type="checkbox"/>	putative mitochondrial hypothetical protein [Leptomonas pyrrocoris]	549	549	99%	0.0	85%	XP_015664473.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate EM1]	486	486	96%	4e-171	73%	CCW64859.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein AGDE_05127 [Angomonas deanei]	481	481	93%	2e-169	74%	EPY38802.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein TM35_000491140 [Trypanosoma theileri]	478	478	95%	3e-168	73%	ORC84108.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein STCU_06661 [Strigomonas culicis]	478	478	94%	5e-168	72%	EPY25582.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	476	476	95%	3e-167	73%	XP_812599.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein BCY84_19192 [Trypanosoma cruzi cruzi]	475	475	95%	4e-167	73%	PBJ69812.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein MOQ_004021 [Trypanosoma cruzi marinkellei]	475	475	95%	4e-167	73%	EKF32135.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	475	475	95%	8e-167	73%	XP_813050.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein DQ04_05361000 [Trypanosoma grayi]	475	475	95%	8e-167	74%	XP_009312411.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein TCSYLVIO_007502 [Trypanosoma cruzi]	475	475	95%	3e-166	73%	EKG01501.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein TCDM_08454 [Trypanosoma cruzi Dm28c]	475	475	95%	4e-166	73%	ESS63684.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma brucei brucei TREU927]	471	471	95%	2e-165	73%	XP_844772.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein TRSC58_07287 [Trypanosoma rangeli SC58]	469	469	95%	1e-164	72%	ESL05102.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate Hart1]	465	465	93%	6e-163	72%	CCW71945.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Trypanosoma congolense IL3000]	464	464	95%	2e-162	71%	CCD14041.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Trypanosoma congolense IL3000]	463	463	95%	2e-162	71%	CCC90378.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Trypanosoma vivax Y486]	457	457	95%	4e-160	72%	CCC47848.1
<input type="checkbox"/>	2OG-Fe(II) oxygenase, putative [Bodo saltans]	457	457	96%	5e-160	70%	CUG06408.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein AGDE_06339 [Angomonas deanei]	380	380	69%	1e-130	78%	EPY37595.1

Figura 9– Análise de similaridade com programa Blast-P da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania infantum* JPCM5) (XP_001468941.1), marcado com o retângulo em verde, com as demais proteínas de *Leishmania* e proteínas de *Trypanosoma*. O retângulo em azul marca as outras proteínas similares de *Leishmania*. Os retângulos em vermelho marcam as proteínas similares de *Trypanosoma*.

A figura 10 mostra a mesma análise com a Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) a similaridade com proteínas de *Leishmania* foi entre 92% e 99%. Estão marcadas no retângulo em verde as proteínas analisadas e no retângulo em azul as proteínas de *Leishmania* com similaridade selecionadas. Todas as outras 10 análises de similaridade com as proteínas de *Leishmania* estão presentes no Anexo B e seguiu o mesmo padrão de análise.

<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	431	431	100%	4e-153	100%	XP_001568689.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein LPMP_350550 [Leishmania panamensis]	428	428	100%	8e-152	99%	XP_010702994.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]	346	346	90%	4e-119	94%	XP_001469551.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	345	345	90%	5e-119	94%	XP_003874397.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein, conserved [Leishmania donovani]	344	344	90%	2e-118	93%	XP_003865174.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin]	340	340	90%	7e-117	92%	XP_001686625.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein ABB37_04962 [Leptomonas pyrrocoris]	327	327	100%	1e-111	75%	XP_015658333.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein ABL78_2693 [Leptomonas seymouri]	322	322	92%	9e-110	80%	KPI88189.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate EM1]	219	219	86%	2e-69	54%	CCW59941.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate Hart1]	216	216	87%	4e-68	54%	CCW67086.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein AGDE_05539 [Angomonas deanei]	209	209	88%	2e-65	52%	EPY38390.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein TM35_000024820 [Trypanosoma theileri]	205	205	88%	7e-64	51%	ORC93156.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein C3747_73q5 [Trypanosoma cruzi]	195	195	87%	5e-60	51%	PWV09942.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein C4863_13q188 [Trypanosoma cruzi]	195	195	87%	5e-60	51%	PWU98128.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	195	195	87%	5e-60	51%	XP_806564.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein BCY84_16153 [Trypanosoma cruzi cruzi]	195	195	87%	8e-60	51%	PBJ71933.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein AGDE_02229 [Angomonas deanei]	191	191	82%	3e-58	51%	EPY41695.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein TRSC58_06018 [Trypanosoma rangeli SC58]	179	179	87%	8e-54	48%	ESL06310.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Trypanosoma vivax Y486]	164	164	92%	9e-48	43%	CCC51451.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein AGDE_05656 [Angomonas deanei]	160	160	60%	7e-47	57%	EPY38273.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma brucei gambiense DAL972]	161	161	90%	2e-46	43%	XP_01177781.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma brucei brucei TREU927]	160	160	90%	5e-46	43%	XP_822744.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [Trypanosoma congolense IL3000]	145	145	92%	4e-40	40%	CCC93652.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	121	121	47%	4e-32	53%	XP_804057.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein STCU_04424 [Strigomonas culicis]	96.3	96.3	39%	2e-22	51%	EPY29597.1
<input type="checkbox"/>	membrane-associated protein, putative [Bodo saltans]	96.7	96.7	79%	1e-21	32%	CUG87248.1

Figura 10– Análise de similaridade com programa Blast-P da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1), marcado com o retângulo em verde, com as demais proteínas de *Leishmania* e proteínas de *Trypanosoma*. O retângulo em azul marca as outras proteínas similares de *Leishmania*. Os retângulos em vermelho marcam as proteínas similares de *Trypanosoma*.

Para analisar as possíveis reações cruzadas destas proteínas com proteínas de outros tripanosomatídeos verificou-se a similaridade entre as sequências de aminoácidos utilizando o algoritmo Blast-p (*protein-protein BLAST*) com parâmetro *non-redundante*. O retângulo vermelho da figura 9 mostra a similaridade da Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) com proteínas do gênero *Trypanosoma* presentes no banco de dados, apresentando similaridade com outras proteínas entre 71% e 74%. O retângulo vermelho da figura 10 demonstra a mesma análise com a Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1). Os retângulos em verde marcam a proteína analisada e os retângulos em vermelho as proteínas de *Trypanosoma* com 43% a 53% de similaridade. Todas as outras análises de similaridade com as proteínas de *Trypanosoma* estão presentes no Anexo B.

Após a seleção das proteínas de *Leishmania* e de *Trypanosoma* com maior similaridade foi feita a predição dos possíveis epítomos lineares. Para isso utilizou-se a sequência de aminoácidos obtida no GenBank e foram colocados no programa ABCpred para prever epítomos lineares de célula B baseado em padrões de comprimento fixo. Os

parâmetros utilizados foram: *Threshold*: 0.84, score igual ou maior a 84% de probabilidade de ser epítopo; *Window length used for prediction*: 14, epítomos com 14 aminoácidos; *Overlapping filter*: ON, com epítomos que podem estar sobrepostos. Nas tabelas 3 e 4 demonstra-se os resultados obtidos nas duas proteínas analisadas Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) e a Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1), respectivamente.

Tabela 3– Predição dos epítomos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania infantum* JPCM5) (XP_001468941.1)

Sequência	Score
RSIMESDGGFRPVKTP	0,86
PPASFMPLLERLEQDN	0,86
FVHVQNGEELDVMVPD	0,87
IMSGPARYVYFHMVLP	0,87
DGRFQLPPLPPASFMP	0,89
AMEESLVSPHVAHVT	0,92
PFKEIMPYRATQILNA	0,94
ERLEQDNVVPKNWLNN	0,95

Tabela 4– Predição dos epítomos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1)

Sequência	Score
GFSGDSSSESYSLSDNS	0,85
LVTSDDIRYMHAFYFN	0,88
AFRISDPPQYSRVVPA	0,90

Na tabela 3 verifica-se que a Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) possui 8 peptídeos que são possivelmente epítomos lineares reconhecidos por linfócitos B, que possuem de acordo com algoritmo do programa uma probabilidade de confiança de ser realmente um epítopo variando entre 95% e 86%.

Na análise de epítomos lineares da Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1), tabela 4, foram identificados pelo programa 3 possíveis epítomos lineares, 1 com 85%, 2 com 88% e 3 com 90% de probabilidade ser realmente epítopo desta proteína.

Para analisar a similaridade entre tais regiões epitópicas foi feito o alinhamento das sequências de aminoácidos das 12 proteínas analisadas com as proteínas similares obtidas no programa Blast-p, para o alinhamento utilizou-se o programa Clustal Ômega. Os resultados das 10 proteínas analisadas estão no Anexo C e D, para exemplificar estão

XP_001468941.1	LKGGSMKYLAAGEPYCPFGAEFGLTILPEYILEDDASNLKRGYVDVYTRASDRILLNDGR	74
CCC47848.1	LNGGSLGYLAADKPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
XP_009312411.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
ORC84108.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
ESL05102.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	86
EKF32135.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
XP_813050.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
ESS63684.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	120
PBJ69812.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
EKG01501.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	120
XP_844772.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
CCD14041.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
CCC90378.1	LNGGSLGYLAAGEPYQPFGEDEFGLTIFPDYVQMEKIALRGGYVDVYQRSASIRLSDGR	71
	* ** : * * . : * : * * : * * * : * * * : * * * : * * * * * : * * * * * * * * *	
XP_001468941.1	FQLPPIPPASFMPLEERLEQDNVVPKNWLNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIC	134
CCC47848.1	FQLPPIPPQHSFLPYERMEQDGI VPCGWLNNTANFYETNDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
XP_009312411.1	FQLPPIPPRSFMNVERIEQDDIVPRGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
ORC84108.1	FQLPPIPPKSFISLERIEQDKIVPRGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
ESL05102.1	FQLPPIPPRSFSLSGRIEQDGI VPAWLNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	146
EKF32135.1	FQLPPIPPRSFSLSGRIEQDGI VPDGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
XP_813050.1	FQLPPIPPRSFSLSGRIEQDGI VPDGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
ESS63684.1	FQLPPIPPRSFSLSGRIEQDGI VPDGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	180
PBJ69812.1	FQLPPIPPRSFSLSGRIEQDGI VPDGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
EKG01501.1	FQLPPIPPRSFSLSGRIEQDGI VPDGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	180
XP_844772.1	FQLPPIPKHSFLPYERLEQDGI VPRGWLNNNTANLYEPEDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
CCD14041.1	FQLPPIPTGSFTPLDRIEQDGI VPRGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
CCC90378.1	FQLPPIPTGSFTPLDRIEQDGI VPRGWLNNNTANLYEPGDFIRAHDNLFVYDDIFAIV	131
	***** *	
XP_001468941.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	194
CCC47848.1	SLGANALLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPSRYVYFHMVLPVEAQRVSIIVFERSIL	191
XP_009312411.1	SLGANALLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	191
ORC84108.1	SLGANALLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	191
ESL05102.1	SLGANALLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	206
EKF32135.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDAVVPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	191
XP_813050.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDAVVPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	191
ESS63684.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDAVVPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	240
PBJ69812.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDAVVPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	191
EKG01501.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDAVVPDGLVIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSIVFERSIL	240
XP_844772.1	SLGANALLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPSRYVYFHMVLPVEAQRVSIIVFERSIL	191
CCD14041.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPSRYVYFHMVLPVEAQRVSVVIFERSIL	191
CCC90378.1	SLGSNLLRFVHVQNGEELDVVDPDGLVIMSGPSRYVYFHMVLPVEAQRVSVVIFERSIL	191
	*** : *	
XP_001468941.1	ESDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDKYLEKEEIGAFDTAKWKV	253
CCC47848.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQIVNNTIYAKQIGGVRVAVNDQFLEEKIIGAFDTARWVK	251
XP_009312411.1	NSDGGFRPVSTELGDMAYRSTQVNTIYAKQIGGVRVAVDDKYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
ORC84108.1	NSDGGFRPVSTELGDLMSYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDKYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
ESL05102.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDKYLEKEEIGAFDTAKWKV	266
EKF32135.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDNYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
XP_813050.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTHILNNTIYAKQIGGVRVAVDDNYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
ESS63684.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDNYLEKEEIGAFDTAKWKV	300
PBJ69812.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDNYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
EKG01501.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDNYLEKEEIGAFDTAKWKV	300
XP_844772.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDKYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
CCD14041.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDKYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
CCC90378.1	NSDGGFRPVSTELGDLMPYRSTQILNNTIYAKQIGGVRVAVDDKYLEKEEIGAFDTAKWKV	251
	*** : *	
XP_001468941.1	RLHPLRDWSLLRQLDEDEARVEELREKRFIDVDFSWRYRELRSYFAMEESLVS PHVAHVT	314
CCC47848.1	GLQPLRDWTLSSQLDEDEVRVDELKEKRYLDVDFSWRFAELRKRYPMEELLRI-----	305
XP_009312411.1	GLHPLRDWSLLSRLDEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLETLTLLGA-----	305
ORC84108.1	GLHPLRDWSLLSRLDEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLELESLSI-----	305
ESL05102.1	GLHPLRDWSLLSRLDEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLELEKLSA-----	320
EKF32135.1	GLHPLRDWSLLSRLDEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLELEELLSV-----	305
XP_813050.1	GLHPLRDWSLLSRLDEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLELEELLSV-----	305
ESS63684.1	GLHPLRDWSLLSRLNEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLELEELLSV-----	354
PBJ69812.1	GLHPLRDWSLLSRLNEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLELEELLSV-----	305
EKG01501.1	GLHPLRDWSLLSRLNEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRFAELRKRYPLELEELLSV-----	354
XP_844772.1	GLHPLRDWTLSSQLDEDEARVLELREKRYLDVDFSWRTELKRYPLEEDMLRV-----	305
CCD14041.1	GLHPLRDWTLSSQLDEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRTELKRYPLELEMLRV-----	305
CCC90378.1	GLHPLRDWTLSSQLDEDEARVQELKDKRYLDVDFSWRTELKRYPLELEMLRV-----	305

Figura 12– Alinhamento das proteínas de *Trypanosoma* similares feito pelo Clustal Ômega de parte da sequência contendo os epítomos preditos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania infantum* JPCM5) (XP_001468941.1). (*) alta similaridade entre os aminoácidos (aminoácidos

iguais); (:) média similaridade entre os aminoácidos; (.) baixa similaridade entre os aminoácidos; () aminoácidos não similares.

As 8 regiões epitópicas lineares obtidas pelo ABCpred (tabela 3) também foram marcadas no alinhamento da proteína hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) com as proteínas similares de *Trypanosoma* (figura 12). O retângulo em vermelho marca estes epítomos em todas as sequências alinhadas. Na última linha do alinhamento está a simbologia da similaridade entre os aminoácidos.

A figura 13, mostra parte do alinhamento da proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) com as proteínas similares de *Leishmania* marcadas na figura 10. As três sequências epitópica lineares apresentadas pelo ABCpred na tabela 4 foram marcadas em vermelho na sequência de aminoácidos alinhada pelo Clustal Ômega, o retângulo em vermelho marca estes epítomos em todas as sequências alinhadas. Abaixo das sequências observa-se a similaridade entre os aminoácidos da proteína analisada com as demais proteínas similares de *Leishmania*. Os resultados mostram uma alta região conservada, com aminoácidos idênticos independente da proteína de *Leishmania*, principalmente para os epítomos da região central e C-terminal.

XP_001568689.1	MGFLGFGSDSSSESYSLSDNSK	KVDDRIKLT	YAE	TVVSL	LATAFGLVI	IVLLDLLYRSTFRH	60
XP_010702994.1	MGFLGFGSDSSSESYSLSDNSK	KVDDRIKLT	YAE	TVVSL	LATAFGLVI	IVLLDLLYRSTFRH	60
XP_001686625.1	MSLFDISPSSSESSSQSDNSK	KVDDRIQLT	YAE	TVVSL	LATAVGLVI	IVLLDLLYRSTSRH	60
XP_003874397.1	MSLFDVSAISSESSSQSDNSK	KVDDRIKLT	YAE	TVVSL	LATAVGLVI	IVLLDLLYRSTSRH	60
XP_001469551.1	MSLFDVSASSSESSSQSDNSK	KVDDRIKLT	YAE	TVVSL	LATAVGLVI	IVLLDLLYRSTSRH	60
XP_003865174.1	MSLFDVSASSSESSSQSDNSK	KVDDRIKLT	YAE	TVVSL	LATAVGLVI	IVLLDLLYRSTSRH	60
	.:.. **** * *****	*****	*****	*****	*****	*****	**
XP_001568689.1	AMLLRVQRETRFDGAYILGKPEGS	RARIILE	ENGLKT	AFRISDPPQYSRVVPA		VSES	RD 120
XP_010702994.1	AMLLRVQRETRFDGAYILGKPEGS	RARIILE	ENGLKT	AFRIIDPPQYSRVVPA		VSES	RD 120
XP_001686625.1	AMLLRVQRETRFDGAYILGKPEGN	RARIILE	ENGLKT	EFRIHPPQYSRVVPA		VSDS	RD 120
XP_003874397.1	AMLLRVQRETRFDGAYILGKPEGN	RARIILE	ENGLKT	EFRIHPPQYSRVVPA		VSDS	RD 120
XP_001469551.1	AMLLRVQRETRFDGAYILGKPEGN	RARIILE	ENGLKT	EFRIHPPQYSRVVPA		VSDS	RD 120
XP_003865174.1	AMLLRVQRETRFDGAYILGKPEGN	RARTILE	ENGLKT	EFRIHPPQYSRVVPA		VSDS	RD 120
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	***
XP_001568689.1	RVNGDEF	LVTSDDIRYMHAFFYN		VLKVLQ			210
XP_010702994.1	RVNGDEF	LVTSDDIRYMHAFFYN		VLKVLQ			210
XP_001686625.1	RVNGDEF	LVTSDDIRYMHAFFYN		VLKVLQ			210
XP_003874397.1	RVNGDEF	LVTSDDIRYMHAFFYN		VLKVLQ			210
XP_001469551.1	RVNGDEF	LVTSDDIRYMHAFFYN		VLKVLQ			210
XP_003865174.1	RVNGDEF	LVTSDDIRYMHAFFYN		VLKVLQ			210
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Figura 13– Alinhamento das proteínas de *Leishmania* similares feito pelo Clustal Ômega de parte da sequência contendo os epítomos preditos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1). (*) alta similaridade entre os aminoácidos (aminoácidos iguais); (:) média similaridade entre os aminoácidos; (.) baixa similaridade entre os aminoácidos; () aminoácidos não similares.

O alinhamento da Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) com as proteínas similares de *Trypanosoma* marcadas na figura 10 está demonstrado na figura 14, em vermelho marcadas as três regiões epitópicas lineares obtidas pelo ABCpred (tabela 4) e o quadrado em vermelho marca estes epítomos em todos as sequências alinhadas. Na última linha está a simbologia da similaridade entre os aminoácidos da proteína Hipotética com as proteínas similares de *Trypanosoma*. Os resultados mostram que os três epítomos não estão presentes nas proteínas de *Trypanosoma*.

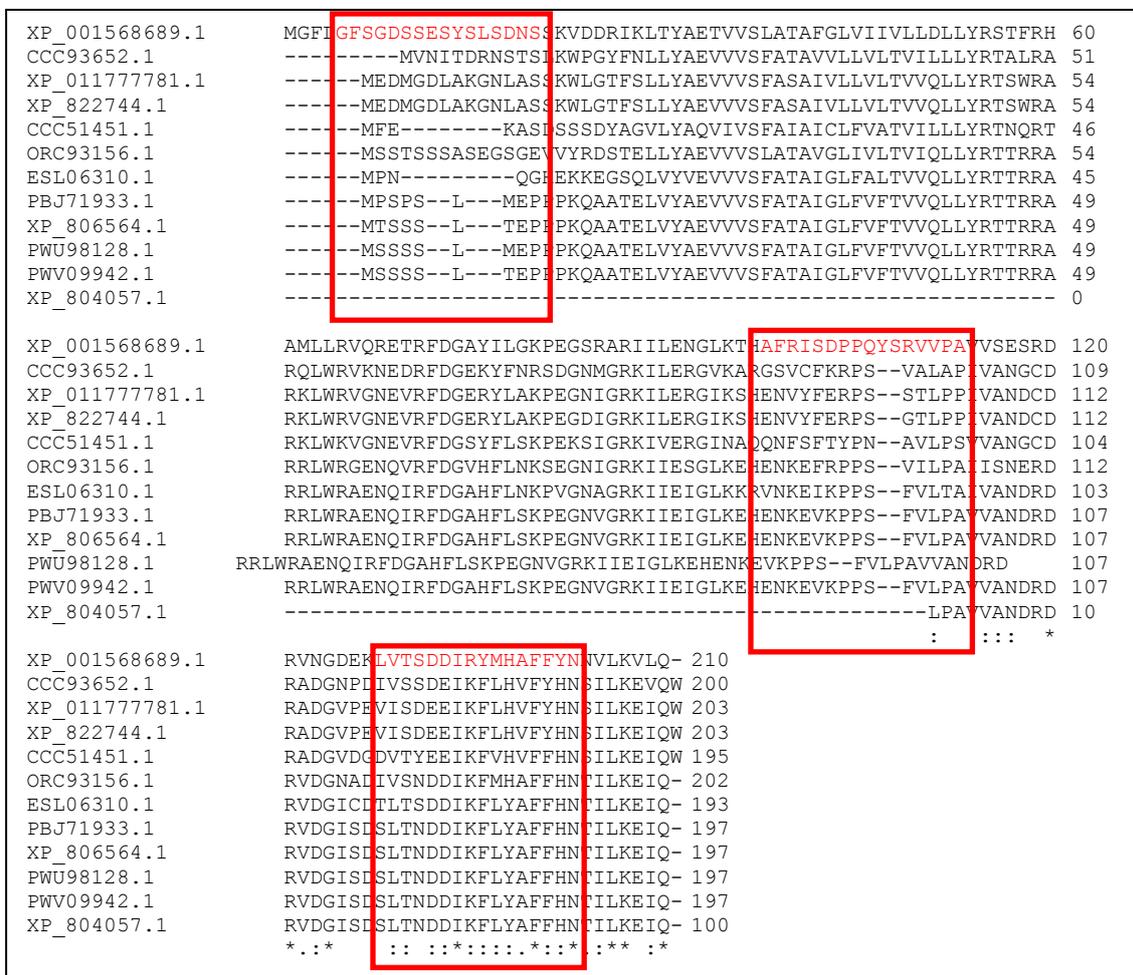


Figura 14– Alinhamento das proteínas de *Trypanosoma* similares feito pelo Clustal Ômega de parte da sequência contendo os epítomos preditos com programa ABCpred da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1). (*) alta similaridade entre os aminoácidos (aminoácidos iguais); (:) média similaridade entre os aminoácidos; (.) baixa similaridade entre os aminoácidos; () aminoácidos não similares.

Após o alinhamento e análise das similaridades dos aminoácidos presentes em cada epítopo predito pelo programa ABCpred as 12 sequências proteicas foram analisadas no programa IEDB para buscar os aminoácidos mais acessíveis na estrutura da proteína sendo estas as possíveis regiões epitópicas. As análises dos programas ABCpred e IEDB com algoritmo *Emini Surface Accessibility Prediction* foram sobrepostas para obter epítopos conformacionais e os resultados das outras 10 proteínas analisadas estão no Anexo E.

A figura 15 mostra a sequência da proteína hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) com a combinação dos epítopos gerados pelo ABCpred marcados em amarelo e em negrito os aminoácidos (aa) acessíveis gerados pelo programa IEDB com escore maiores, entre 4 e 5 (considerados aminoácidos mais acessíveis). Os resultados mostram que ao combinar as análises alguns segmentos de aminoácidos aparecem como resultados comuns entre os dois programas, como GRFQ, RLEQDNVV, WLNN e PVKTPF.

```

1 MSIVSRFIGGAKHLLKGGSMKYLAAGEPYCPFGEAFGLTILPEYILEDDASNLRKGYVDV
61 YTRASDRIILNDGRFQLPPLPPASEFMPLLRLEODNVVPKNWLNNQTANLYEPGDFIRAH
121 IDNLFVYDDIFAICSLGSNCLLRFVHVQNGEELDVMVPDRSVYMSGPARYVYFHMVLPV
181 EAQRFSLVFRRSIMESDGGFRPVKTPFKEIMPYRATQILNALYSKQVGGVRVSVDDDFLE
241 SANIGAFDTSRWVKRLHPLRDWSSLRQLDEDEARVEELREKRFIDVDFSWRYRELSYYK
301 AMEESLVSPHVAHVTPQA

```

Figura 15– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania infantum* JPCM5) (XP_001468941.1) com análise combinada dos programas ABCpred e IEDB. Epítopos lineares obtidos pelo ABCpred: Regiões marcadas em amarelo; Aminoácidos acessíveis obtidos pelo IEDB: negrito. Os retângulos em vermelho mostram os aminoácidos escolhidos para formar o epítipo sintetizado.

Ao analisar todos os resultados visto até agora, a sobreposição das análises da Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) sugerem as regiões de epítipo com alta similaridade com outras proteínas de *Leishmania*, baixa similaridade com proteínas de *Trypanosoma* e que contém aminoácidos mais acessíveis. Assim, ao pegar os dois segmentos maiores obtidos na figura 15, é possível extrair as sequências de aminoácido que juntas formam um ótimo candidato a epítipo conformacional. Portanto a sequência de 13aa selecionada para tal foi:

RLEQDNVVPKTP

A sequência foi alterada a fim de transformar esse peptídeo solúvel em água, sendo assim buscou-se aminoácidos vizinhos aos selecionados que transformariam o peptídeo em solúvel. Desta forma foi selecionado o aminoácido arginina, fazendo com que o peptídeo

assumisse um caráter básico, conferindo solubilidade em água. Gerando a sequência final demonstrada abaixo:

RLEQDNVVRPVKTP

A figura 16 mostra a sequência da proteína Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) com os epítomos gerados pelo ABCpred marcados em amarelo e em negrito os aminoácidos (aa) mais acessíveis gerados pelo programa IEDB com score entre 5 e 4. Os 3 epítomos sugerido pelo programa ABCpred possui regiões com aminoácidos acessíveis. A análise combinada mostra que segmentos de aminoácidos aparecem como resultados comuns entre os dois programas: DSSSEY, SDPPQYSR, LVTS e DIR.

```

1  MGFLGFSGDSSSEYSLSDNSSKVVDDRIKLYAETVVSLATAFGLVIVLLDLLYRSTFRH
61  AMLLRVQRETRFDGAYILGKPEGSRARIILENGLKTHAFRI SDPPQYSR VPAVVSESRD
121 AKKDCVEMLSKVRTILAKSYGRCAELMSMRCLACVTGALPAEQSERFLRIYERVMFCSH
181 RVNGDEK LVTS DIRYMHAFFYNNVCLKVLQ

```

Figura 16– Sequência da proteína Hypothetical Protein NCBI (*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904) (XP_001568689.1) com análise combinada dos programas ABCpred e IEDB. Epítomos lineares obtidos pelo ABCpred: Regiões marcadas em amarelo; Aminoácidos acessíveis obtidos pelo IEDB: negrito. Os retângulos em vermelho mostram os aminoácidos escolhidos para formar o epítopo sintetizado.

Portanto as regiões de epítopo com alta similaridade com outras proteínas de *Leishmania*, baixa similaridade com proteínas de *Trypanosoma* e que contém aminoácidos mais acessíveis seriam candidatos a gerar um epítopo conformacional. Como o epítopo da região N-terminal apresentou uma similaridade com outras proteínas de *Leishmania* inferior aos outros dois epítomos, ele foi descartado.

Sendo assim, 13aa foram selecionados para tal e a sequência proposta foi:

SDPPQYSRLVTSD

Afim de demonstrar a eficiência das ferramentas de bioinformática na produção de epítomos conformacionais que podem ser utilizados em diagnósticos imunológicos foi realizada a síntese de peptídeos das duas sequências geradas acima bem como o uso destes peptídeos como antígeno em testes ELISA.

Foram sintetizados os dois epítomos conformacionais preditos utilizando a técnica química de Fmoc-Synthesis (Machado-De-Avila et al., 2011). Os peptídeos sintetizados foram liofilizados e submetidos ao teste de antigenicidade utilizando a técnica ELISA frente a diversos soros de cães com LV e de pacientes com LT.

Para o peptídeo gerado a partir de Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1), por se tratar de um antígeno de *L. infantum*, a proteína foi testada

como antígeno de cobertura no teste ELISA frente a soros de cães com LV. Para realizar a comparação da antigenicidade da proteína sintética testada utilizou-se SLA de *L. infantum* (antígeno solúvel de *L. infantum*) como controle, constituído de todas as proteínas solúveis presentes na espécie. A soroteca canina utilizada contendo diversos grupos descritos anteriormente na metodologia: 9 Soros Positivos Assintomáticos (SPA), 45 Soros Positivos Sintomáticos (SPS), 20 Soros Negativos de Área Endêmica (SNAE), 50 Soros Negativos de Área Não Endêmica (SNANE), 30 Soros Vacinados com Leish-tec® (SVLT), 10 Soros com *Trypanosoma cruzi* (STC), 10 Soros *Erlichia canis* (SEC) e 10 Soros *Babesia canis* (SBC).

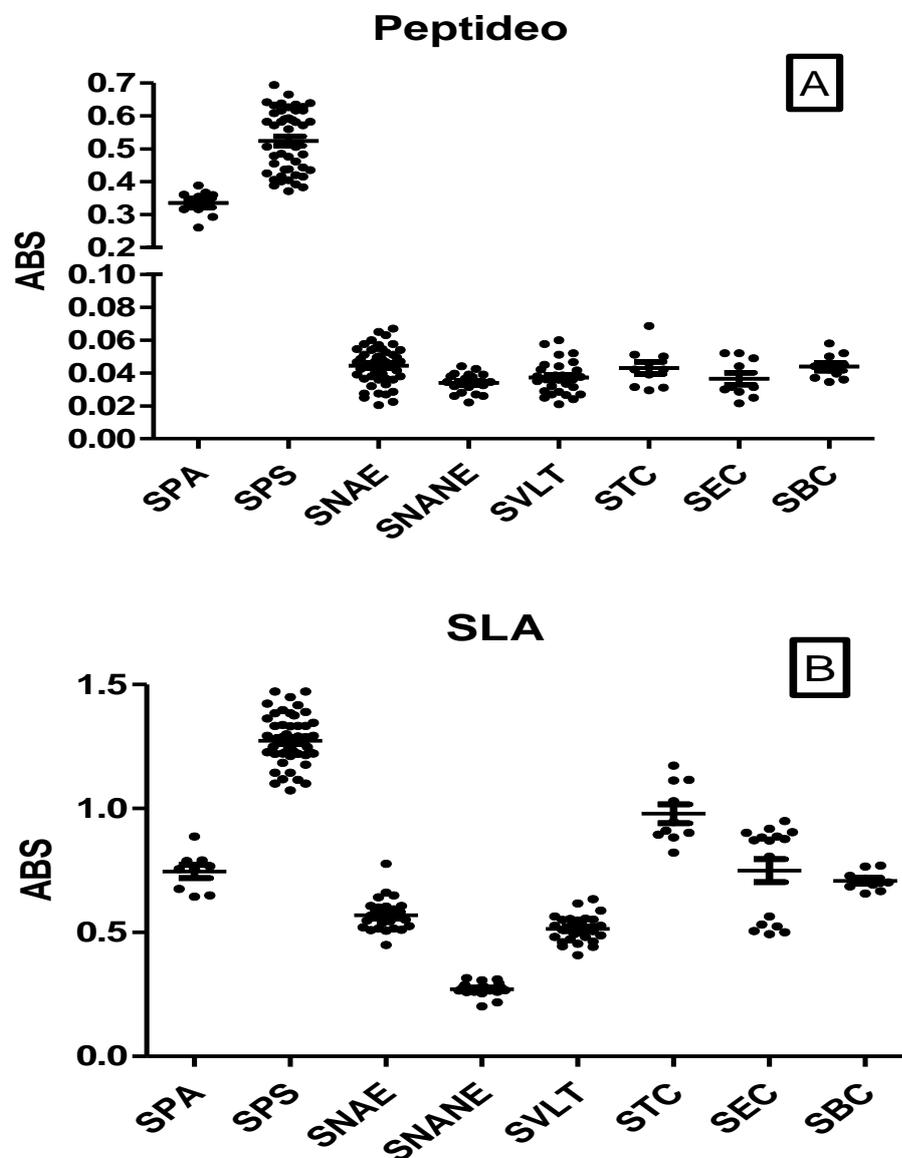


Figura 17 – Gráfico com a reatividade dos soros de cães pelo teste ELISA medida em absorvância (ABS) utilizando o peptídeo de *L. infantum* e SLA (antígeno solúvel de *L. infantum*) como antígenos de cobertura. Em

A os soros testadas contra peptídeo de *L. infantum*. Em B os soros testados contra SLA. SPA, soro positivo assintomático; SPS, soro positivo sintomático; SNAE, soro negativo de área endêmica; SNANE, soro negativo área não endêmica; SVLT, soro vacinado Leish- Tec®; STC, soro *T. cruzi*; SEC, soro *Erlichia canis*; SBC, soro *Babesia canis*.

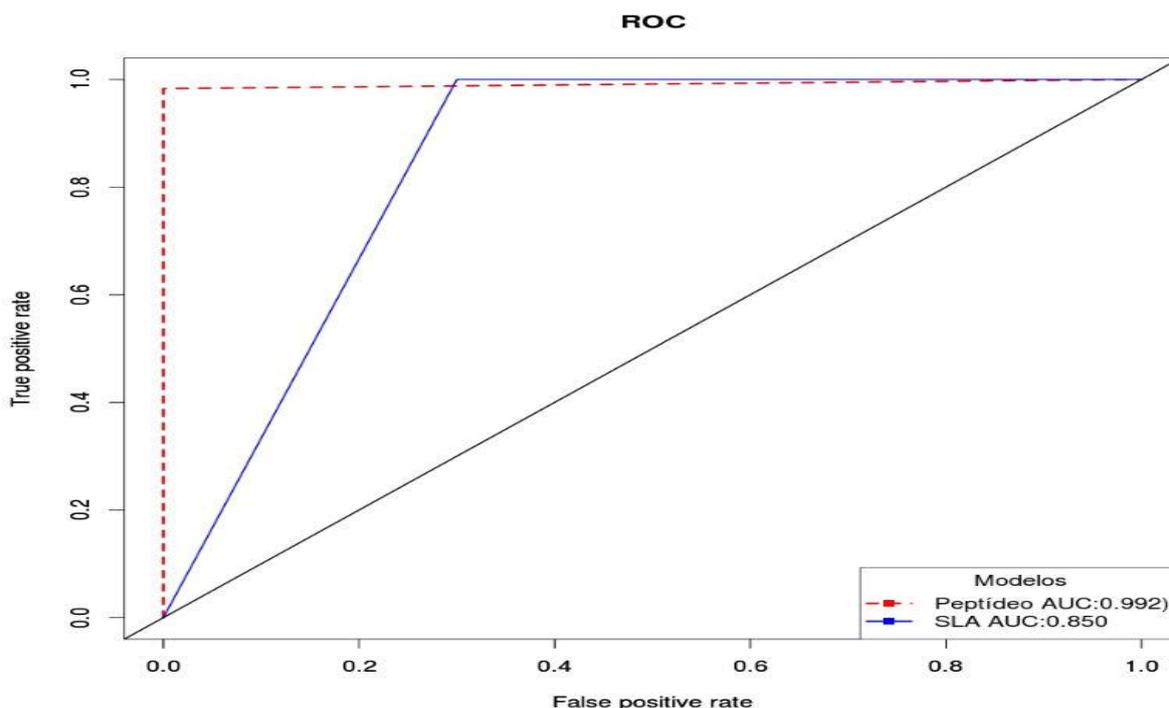
Os resultados do teste ELISA para o SLA e para o peptídeo de *L. infantum* sintetizado foram avaliados quanto a sua reatividade e calculados os parâmetros de sensibilidade (Se), especificidade (Es) e área sob a curva (AUC) segundo metodologia já descrita.

A figura 17 mostra a Densidade Óptica (em absorbância- ABS) do peptídeo de *L. infantum* sintético e do SLA frente aos grupos de soros de cães com LV, dos controles negativos, dos vacinados e dos infectados com outras patologias.

Os valores médios de ABS obtidos na reatividade dos soros frente ao peptídeo sintetizado de *L. infantum* foram maiores para os soros positivos, com a média de 0,335 para SPA e 0,496 para SPS. Para os soros negativos observa-se absorbâncias menores e apresentaram valores médios de 0,044 para SNAE, 0,033 para SNANE, 0,037 para SVLT, 0,043 para STC, 0,036 para SEC e 0,043 para SBC. Havendo uma ótima distinção entre os valores médios entre os grupos de soros positivos e os grupos de soros negativos (figura 17A).

Tal distinção já não é vista na figura 17B que apresenta as ABS dos soros frente ao SLA com as médias dos soros positivos 0,745 para SPA e 1,273 para SPS; e dos soros negativos valores médios de ABS de 0,586 para SNAE, 0,271 para SNANE, 0,514 para SVLT, 0,979 para STC, 0,886 para SEC e 0,708 para SBC. Observa-se que para as médias dos soros negativos STC, SEC e SBC apresentaram valores elevados e similares os grupos de soros positivos.

A curva ROC apresentada na figura 18 mostra a comparação entre a funcionalidade do peptídeo de *L. infantum* sintetizado e do SLA frente a reatividade com os grupos de soros de cães. Os valores de sensibilidade das duas curvas ROC mostradas, em azul o teste com SLA e em vermelho o teste com peptídeo sintético de *L. infantum*, apresentam valores muito próximos a 1 (100%) de sensibilidade nos dois testes. Estes resultados demonstram que não há alteração dos verdadeiros positivos com os dois tipos de antígeno. Porém quando se observa a especificidade, valores de falsos negativos, verifica-se que o peptídeo sintetizado possui valor próximo a zero, logo apresentando 100% de especificidade; e o testes utilizando o SLA em torno de 0,3, ou seja 97% de especificidade, sendo o peptídeo sintético mais específico. Tais resultados são confirmados através da acurácia dos testes, que para o peptídeo sintetizado apresentou valores 0,992 (99%) e para o SLA 0,850 (85%),



demonstrando assim uma maior eficiência no teste utilizando o peptídeo predito sintetizado de *L. infantum*.

Figura 18– Curva ROC comparando a reatividade de anticorpos presente nos soros dos grupos de cães frente ao peptídeo sintetizado e o SLA. A curva ROC do peptídeo predito está representada em vermelho e do SLA em azul. No eixo X estão as proporções de verdadeiros positivos e no eixo Y as proporções de falsos positivos.

Testes semelhantes aos descritos acima, que comprovam a antigenicidade dos peptídeos gerados com auxílio da bioinformática e sintetizados, foram realizados para a Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1). Os testes mostrados a seguir são desta proteína testada como antígeno de cobertura no teste ELISA frente a soros de pacientes com formas Tegumentares da Leishmaniose, já que o peptídeo predito é proveniente de uma proteína de *L. braziliensis*.

A soroteca humana utilizada, descrita anteriormente na metodologia, é composta de: 20 soros como controle Negativos, 35 soros de pacientes com as manifestações Tegumentares de Leishmaniose, sendo 20 soros de pacientes com a forma de Leishmaniose Mucosa (muco-cutânea) e 15 com a forma de Leishmaniose Cutânea.

A figura 19 mostra a reatividade do peptídeo de *L. braziliensis* e de SLA frente a soroteca humana descrita. Na figura 19A observa-se os valores de ABS apresentados no teste ELISA com SLA como cobertura. Este gráfico possui *cut-off* de 0,55, sendo assim os valores abaixo desta ABS foram considerados negativos e valores acima foram considerados positivos. Observa-se que o SLA de *L. braziliensis* detectou como positivo os soros de

leishmaniose mucosa e os soros de leishmaniose cutânea, com exceção de um, e todos os soros de pacientes com doença de Chagas.

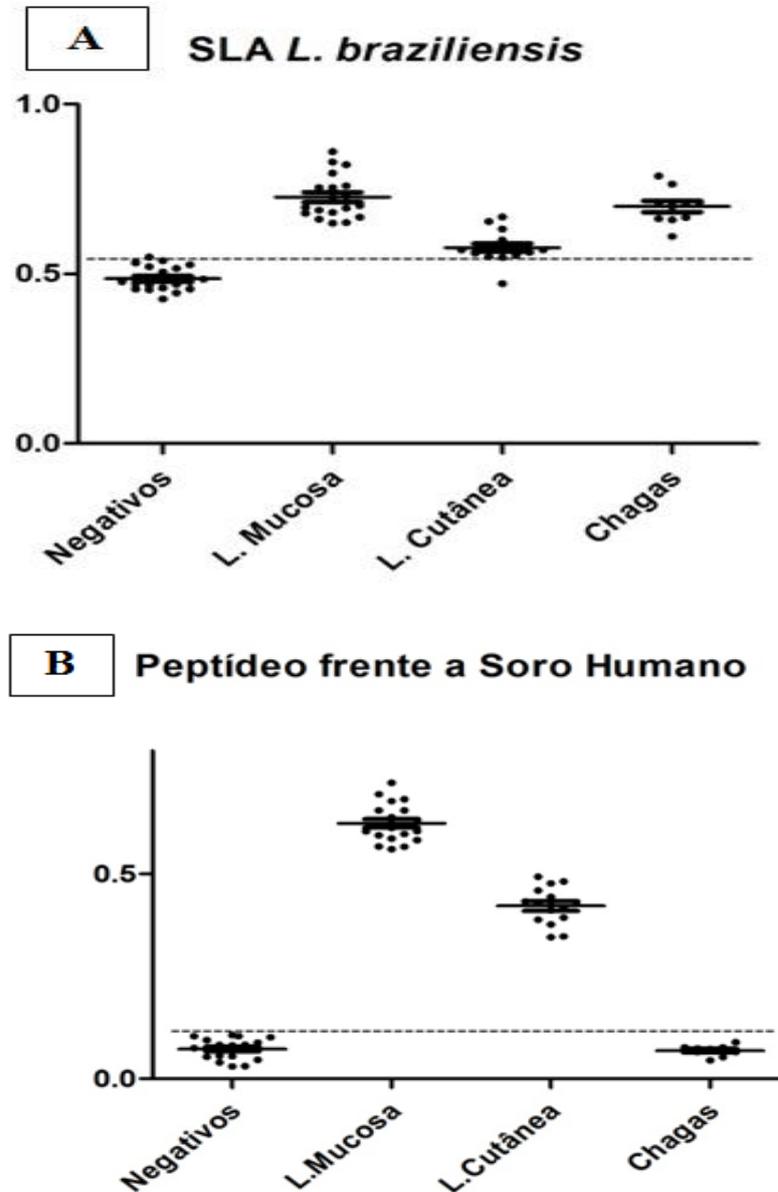


Figura 19– Gráfico com a reatividade dos soros humanos pelo teste ELISA medida em absorbância (ABS) utilizando o peptídeo de *L. braziliensis* e SLA (antígeno solúvel de *Leishmania*) como antígenos de cobertura. Em A os soros testados contra peptídeo de *L. braziliensis*. Em B os soros testados contra SLA. Os soros humanos utilizados nos testes foram de pacientes com as formas Tegumentar de Leishmaniose Muco-cutânea (*L. mucosa*) e Leishmaniose Cutânea (*L. Cutânea*), pacientes com doença de Chagas; e como soros negativos pacientes sadios.

No entanto a figura 19 B mostra os valores de ABS para os testes ELISA utilizando o peptídeo sintetizado de *L. brazileinsis* em que o valor de *cut-off* foi de 0,12. Este peptídeo detectou apenas os soros com leishmaniose cutânea e mucosa como positivos, sendo

os casos negativos e os casos de doença de Chagas classificados no teste como negativos, havendo uma maior distinção entre os resultados.

De acordo com a tabela 5 o peptídeo sintético de *L. braziliensis* identificou todas as amostras positivas para leishmaniose, sem apresentar resultados falso-positivos, obtendo assim 100% de sensibilidade. Em relação ao SLA 34 dos 35 soros positivos para leishmaniose foram identificados, apresentando então um (01) resultado falso negativo, obtendo sensibilidade de 97%.

Tabela 5 – Estatística de comparação entre o peptídeo de *L. braziliensis* e o extrato frente ao Soro Humano.

Avaliação	Sensibilidade (VP/Total de Positivos)	Especificidade (VN/Total de Negativos)	Acurácia (VP+VN/P+N)
Peptídeo	1 (35/35)	1 (30/30)	1 (65/65)
Extrato SLA	0,97 (34/35)	0,66 (20/30)	0,83 (54/65)

Ao avaliar a especificidade dos dois antígenos verifica-se que o peptídeo sintetizado apresentou especificidade de 100%, sendo capaz de identificar todos os soros negativos. Porém os testes com SLA mostram uma baixa especificidade de 66%, havendo detecção de 10 soros de pacientes com Doença de Chagas como positivos para Leishmaniose. Portanto do total de 30 verdadeiros negativos portadores de Doença de Chagas apenas 20 foram identificados com negativos.

A tabela 5 também mostra a acurácia (AUC) dos dois antígenos testados, com 100% de confiabilidade nos testes ELISA que utilizam o peptídeo sintético e 83% de confiabilidade nos testes ELISA que utilizam o SLA.

Tanto os resultados dos testes com o peptídeo sintetizado de *L. infantum* como os resultados com o peptídeo sintetizado de *L. braziliensis* demonstram que os procedimentos de bioinformática mostrados neste trabalho são ferramentas eficazes na construção de epítopos conformacionais que tornam os diagnósticos imunológicos das Leishmanioses mais específicos e mais confiáveis.

Tais resultados geraram o depósito de duas patentes de Invenção. A patente de invenção BR 10 2016 029501 7, intitulado “Peptídeo Conformacional, Método e Kit para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral”, depositada em 15 de dezembro de 2016, trata-se do peptídeo de *L. infantum* sintético com sua respectiva sequência obtidos a partir da proteína (XP_001468941.1), o método *in silico* utilizado para se obter a sequência epitópica e o kit de

diagnóstico para LV (Coelho et al., 2016). E a patente de invenção BR 10 2017 013604 3 com o título “Peptídeo Conformacional Recombinante, Kit e Método para Diagnóstico das Leishmanioses, e Uso” , depositada em 22 de junho de 2017. Trata-se de um peptídeo conformacional obtido a partir da proteína de *L. braziliensis* (XP_001568689.1), o kit e método para o diagnóstico das Leishmanioses (Coelho et al., 2017).

5 DISCUSSÃO

As Leishmanioses são doenças negligenciadas e por estarem relacionadas a presença dos vetores em regiões tropicais e subtropicais apresentam ampla distribuição geográfica. Apesar de serem descritas como doenças antigas são ainda hoje um grande problema de saúde pública em 102 países (Burza et al., 2018). Segundo a OMS em 2016 sete países foram os responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de LV. Este quadro não difere muito para LT onde 84% da incidência mundial da doença é relatada em 10 países (WHO, 2018). No Brasil é considerada como uma das grandes endemias (Alvar et al., 2012). O número de casos de LT no Brasil, segundo o Ministério da Saúde em 2016, foram de 12.690 novos casos e de LV 3200 novos casos (Ministério da Saúde, 2016).

Em virtude deste cenário das Leishmanioses no Brasil e no mundo faz-se necessário a adoção de políticas de controle que busquem medidas de profilaxia eficazes (Alvar et al., 2012). Dentre tais medidas destacam-se as medidas de controle dos reservatórios com diagnóstico eficiente e tratamento adequado de animais, principalmente cães que se encontram inseridos em áreas de comum acesso ao homem e são considerados nas áreas urbanas os principais reservatórios da infecção (Coura-Vital et al., 2013); Além disso não menos importante as medidas de controle dos casos humanos, em que são necessários o diagnóstico oportuno e tratamento adequado das pessoas infectadas (Ministério da Saúde, 2017).

Para um diagnóstico mais eficiente das Leishmanioses deve-se levar em consideração aspectos epidemiológicos e o quadro clínico dos pacientes associados a testes laboratoriais. Por ser uma doença de amplo espectro clínico na maioria das vezes não é possível se chegar ao diagnóstico sem a realização de testes sorológicos ou parasitológicos (Hirschmann et al., 2015). Sendo assim, existem várias metodologias a serem utilizadas para tal finalidade, porém cada método de diagnóstico laboratorial possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas de acordo com o caso (Lunedo et al., 2012). Os métodos parasitológicos por exemplo são considerados de alta especificidade para o diagnóstico da LT, porém é necessária coleta do material sendo considerado invasivo. Além disso sua sensibilidade varia dependendo da localização geográfica, espécie do parasita e estágio da lesão. Para ser considerado mais sensível é recomendado a associação de múltiplos testes (WHO, 2010; Ministério da Saúde, 2014). Para o diagnóstico parasitológico da LV a punção esplênica é altamente invasiva, porém é a amostra de maior sensibilidade, cerca de 90%, e essa limitação se deve a distribuição do parasita nos tecidos (Srivastava et al. 2013;

Burza et al. 2018). Entre os métodos parasitológicos a técnica de PCR apresenta vantagens como aumento da sensibilidade, que pode ser variável de acordo com a metodologia adotada e a região alvo da amplificação (De Paiva-Cavalcanti et al., 2015; De Moraes et al., 2016). No diagnóstico de LV humana a PCR convencional pode chegar a 97,78% de sensibilidade e 100% de especificidade, e para LV canina 98,7% de sensibilidade e 96,4% de especificidade (De Paiva-Cavalcanti et al., 2015). As desvantagens desta técnica estão relacionadas ao alto custo, ao uso de equipamentos e infraestrutura laboratorial especializada, a necessidade de técnicos capacitados e ao risco de contaminação durante a realização dos exames (Ministério da Saúde, 2017). O teste de Hipersensibilidade de Montenegro é usado apenas para o imunodiagnóstico de LT cutânea e mucocutânea, já que não é positivo para LV e nem para LT difusa. Esta metodologia também está limitada ao diagnóstico de doenças agudas, pois doenças crônicas podem apresentar uma diminuição da resposta imune (Weigle et al., 2002).

Portanto os testes sorológicos têm sido uma alternativa de fácil execução, baixo custo e que diminui a necessidade infraestrutura laboratorial e equipamentos sendo pouco invasivos (Nicolato et al., 2013). No entanto a sensibilidade e a especificidade destes testes podem variar devido a diversos fatores como a metodologia empregada, a resposta imune do paciente e ao antígeno utilizado no teste. Dentre os testes imunológicos pode-se listar: a aglutinação direta com sensibilidade 99% e especificidade 98,2% para diagnóstico de LV segundo Oliveira et al. (2013). Todavia a técnica possui limitações quanto a sua execução, longo tempo de incubação e reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos (Sarkari et al., 2018); a técnica de RIFI que é amplamente utilizada por possuir vantagens como na coleta do material, não necessitando de infraestrutura laboratorial nem pessoal especializado. Porém o teste apresenta normalmente especificidade baixa, tendo reatividade cruzada em pacientes com tuberculose, toxoplasmose, malária, febre tifoide ou brucelose. Sendo assim, esta metodologia normalmente é empregada como triagem e devem estar associados a outros teste (Hirschmann et al., 2015; Ministério da Saúde, 2017); e o teste ELISA que é um método sorológico acessível, de média complexidade para sua execução, porém de maior confiabilidade quando comparado aos outros métodos sorológicos, porém sua especificidade e sensibilidade ainda pode ser variável dependendo da metodologia e do antígeno utilizado (Burza et al., 2018).

Na busca incessante por testes mais rápidos, de fácil execução e com preço acessível vários kits de diagnóstico vêm sendo estudados e lançados no mercado. Normalmente estes kits são baseados nas técnicas de imunocromatografia ou de ELISA, porém o que se tem visto é que o grande diferencial não está na metodologia empregada e sim

na escolha de um bom antígeno que seja altamente específico (Assis et al., 2008; Srivastava et al., 2013).

Sabendo que os diagnósticos das várias formas de Leishmaniose são falhos a comunidade científica busca uma metodologia que seja mais confiável, mais sensível e específica. Com este intuito vários trabalhos têm sido realizados na busca por antígenos para produção de kits diagnóstico mais eficientes para os diversos tipos de Leishmaniose. Tais pesquisas propõem a utilização de antígenos quimicamente definidos e específicos tanto para os diagnósticos da LT e da LV humana quanto para o diagnóstico canino (Lira, 2005; De Paiva-Cavalcanti et al., 2015).

Um antígeno muito utilizado e testado no diagnóstico da LV é o antígeno recombinante K39 (rK39), que possui um epítipo muito conservado entre as espécies de *Leishmania* com tropismo para os órgãos viscerais, este também tem se mostrado sensível e específico para o diagnóstico da LVC (Lira, 2005). Outro recombinante muito utilizado para o diagnóstico da LV é o A2, esse antígeno é expresso em amastigotas. Segundo revisão feita por De Paiva-Cavalcanti et al. (2015) alguns trabalhos demonstram também que o uso de gp63 recombinante ou purificado, gp72 ou gp70 que melhoram a sensibilidade e especificidade do teste ELISA.

Sendo assim vários trabalhos do nosso grupo tem se baseado na identificação por imunoproteômica feita por Coelho et al. (2012) de proteína presentes nas formas promastigotas e formas amastigotas de *Leishmania infantum* e *L. braziliensis* que foram reconhecidas por soros de cães com LV e nos resultados obtidos por Duarte et al. (2017) que demonstram a reatividade destas proteínas frente a soros de pacientes com LTH. Diversas proteínas Hipotéticas purificadas, sintetizadas ou recombinantes foram testadas pelo grupo para fins de diagnóstico imunológico das Leishmanioses (Costa et al., 2014; Lage et al., 2016b, 2016a; Lima et al., 2017). Tais avanços inovadores são importantes na compreensão da biologia molecular dos parasitas e permitem o desenvolvimento de ligantes de alta afinidade para vários alvos macromoleculares. Portanto, análises de proteômica e de Bioinformática têm se mostrado importantes ferramentas, tanto para identificação de proteínas utilizadas como diagnóstico ou vacinas como para tratamento das Leishmanioses (Martins et al., 2015; Ferreira e Andricopulo, 2018). Ravooru et al. (2014) mostra que a análise *in silico* de proteínas hipotéticas de importantes vias metabólicas podem ser alvos de novas drogas para o tratamento das Leishmanioses.

No presente trabalho 12 proteínas descritas no trabalho de Coelho et al. (2012), com potencial para serem utilizadas como imunobiológicos, foram analisadas por meio de

programas de Bioinformática. Tal metodologia foi utilizada como ferramenta para se encontrar antígenos ideias que possam ser utilizados no diagnóstico imunológico das leishmanioses. As sequências de aminoácidos das proteínas de *Leishmania* foram obtidas através do GenBank, banco de dados do NCBI de uso público que contém informação sobre sequências nucleodídicas de aproximadamente 260.000 espécies (<http://www.genebio.ufba.br>). Os dados obtidos no GenBank demonstraram que 6 proteínas analisadas são descritas no gênero *Leishmania* com função conhecida e 6 proteínas são descritas como hipotéticas, ou seja, ainda não possuem função biológica conhecida. Tais proteínas estão sendo testadas em diversos trabalhos do grupo com objetivo

A partir das sequências proteicas e dos dados de cada proteína analisada foi verificada a similaridade destas sequências com outras proteínas de *Leishmania* assim como com proteínas do gênero *Trypanosoma* utilizando para tal o programa Blast com o algoritmo Blast-p (*protein-protein BLAST*) e parâmetro *non-redundante*.

Uma proteína que seriam uma boa candidata a antígeno diagnóstico deve conter sequências conservadas no gênero *Leishmania*, dando mais sensibilidade ao teste, e regiões pouco conservadas em *Trypanosoma*, tornando-o mais específico e com menos reações cruzadas. As reações cruzadas entre os tripanosomatídeos tem sido descrita na literatura como a principal desvantagem dos testes ELISA (Nascimento, 2012; Ribeiro et al., 2015). Trabalhos como o de Matos et al., (2015) e Santos et al., (2016) demonstram a ocorrência da reatividade cruzada entre Doença de Chagas e Leishmaniose em regiões endêmicas, demonstrando ser um grande problema para o diagnóstico das duas doenças. Portanto, as análises de similaridade das duas proteínas demonstradas neste trabalho, Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* e Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) evidenciam o potencial de ambas de serem bons antígenos diagnósticos.

Contudo, um bom antígeno deve primeiramente ser reconhecido pelo sistema imunológico. Desta forma deve existir uma ligação molecular específica, interação complementar das bases, entre a região de ligação do receptor de células B ou T e uma porção do antígeno, conhecido como epítipo (Kozlova, 2016). Tal interação resulta na ativação de uma resposta imune específica contra o antígeno. Os linfócitos B que fazem este reconhecimento passam a produzir anticorpos específicos sendo que esta interação com antígenos ocorre quando estes estão livres em solução. Sendo assim, epítopos para fins de diagnóstico normalmente se referem a epítopos reconhecidos por Linfócitos B (Kozlova, 2016). Vários programas de bioinformática podem ser utilizados na busca de epítopos

específicos, tanto de células B quanto de células T, neste trabalho foi utilizado o programa ABCpred que prediz epítomos lineares específicos de linfócitos B. Tal programa tem como principal vantagem a sua disponibilidade gratuita na web e seu fácil manuseio, não sendo necessário o domínio de uma linguagem computacional (Sanchez-Trincado et al., 2017).

As sequências proteicas avaliadas neste trabalho foram alinhadas com as sequências similares obtidas no Blast, além de analisada a similaridade dos aminoácidos através do programa Clustal Ômega, destacando assim as regiões de maior e menor similaridade. Sendo assim, as regiões epitópicas obtidas no ABCpred foram marcadas em cada sequência proteica e marcadas nas sequências alinhadas pelo Clustal Ômega. Tais sobreposições das análises proporcionam maior confiabilidade das análises *in silico*.

Em trabalho anterior do nosso grupo epítomos lineares e conformacionais gerados a partir da combinação dos programas IEDB, Bepipred e ABCpred se mostraram bons candidatos a antígeno diagnóstico das leishmanioses. Estes resultados confirmam que a sobreposição de análises de programas para geração de epítomos é eficiente e dá mais confiabilidade as análises *in silico* (Lage et al., 2016b).

Dos 8 possíveis epítomos lineares reconhecidos por linfócitos B na Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) verificou-se que a maior parte dos aminoácidos são conservados para no gênero *Leishmania*. Porém as regiões epitópicas quando alinhadas com as sequências de *Trypanosoma* se mostram pouco conservadas, confirmando assim a possível utilização dos epítomos específicos no diagnóstico das Leishmanioses.

Para Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) das 3 regiões epitópicas sugeridas pelo ABCpred duas podem ser consideradas potencialmente como bons epítomos diagnósticos por serem altamente conservadas em *Leishmania* e pouco conservadas em *Trypanosoma*. Estes resultados demonstram que os epítomos gerados apresentam tanto regiões ideais como regiões que provavelmente levariam a reatividade cruzada com ligação de anticorpos gerados por outras infecções, incluindo patógenos do gênero *Trypanosoma*.

Estes resultados também mostram a necessidade de geração de epítomos conformacionais composto de diversos fragmentos dispersos ao longo da sequência da proteína e reunidos na proximidade espacial quando a proteína é enovelada (Huang et al., 2006). Ainda, este tipo de estrutura epitópica mimetizaria epítomos reais, pois a maioria dos epítomos reconhecidas por linfócitos B são conformacionais e não lineares (Sanchez-Trincado et al., 2017). Lage, et al. (2016b) mostra que quando testados dois epítomos sintéticos lineares

e um epítopo sintético conformacional de células B gerados a partir de proteínas de *L. infantum* o epítopo conformacional demonstra maior eficiência como antígeno diagnóstico quando comparado aos epítomos lineares.

Sendo assim, foi utilizado o programa IEDB para gerar os epítomos conformacionais com algoritmo *Emini Surface Accessibility Prediction* buscando os aminoácidos mais acessíveis gerando assim através da sobreposição das análises de bioinformática as sequências peptídicas com maior probabilidade de serem bons epítomos conformacionais para uso de diagnósticos. Deve-se ressaltar que o IEDB é um programa que contém um enorme banco de dados com mais de 600.000 epítomos únicos, incluindo peptídeos imunogênicos, produtos químicos entre outros. Além de ser disponível gratuitamente online a IEDB disponibiliza observações sobre como os epítomos foram identificados, sobre o tipo de imunização, o tipo de antígeno, o tipo de ensaio e sobre algumas análises dos peptídeos o que dá mais confiabilidade ao programa (Kozlova, 2016).

Os peptídeos gerados a partir das análises anteriores foram testados como antígenos diagnósticos do método ELISA, confirmando assim a proposição de que a bioinformática se mostra uma importante ferramenta de auxílio na busca por epítomos e antígenos a serem utilizados em imunodiagnósticos.

Quando se utilizou o peptídeo de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) no teste ELISA frente a reatividade da soroteca canina observa-se um aumento da eficiência do ELISA se comparado ao teste ELISA com cobertura de SLA (antígeno solúvel de *L. infantum*). Nas análises da curva ROC o peptídeo sintético de *L. Infantum* apresentou uma semelhança ao SLA quanto a sua sensibilidade (próximos a 100%) demonstrando assim que os dois antígenos reagem com todos os soros positivos, não havendo falsos negativos. Os testes revelam porém um aumento na especificidade (100%) quando utilizou-se o peptídeo sintético comparado ao SLA (97%). Isto indica que o peptídeo sintetizado de *L. infantum* é capaz de diminuir as reações cruzadas frequentes no diagnóstico na LVC, diferentemente do SLA que é reativo principalmente em amostras de cães com outras patologias, gerando um percentual de 3% de diagnósticos falso positivos. A acurácia obtida no nosso trabalho para o peptídeo sintetizado de *L. infantum* foi de 0,992 (99%) e para o SLA 0,850 (85%), demonstrando assim uma maior eficiência no teste utilizando o peptídeo sintetizado.

Os resultados obtidos no ELISA de SLA corroboram com o trabalho de validação do teste EIE para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (EIE-LVC) produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) que mostra a acurácia do teste

ELISA composto de antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* (Nascimento 2012). Este teste é comercializado hoje em todo Brasil e recomendado pelo Ministério da Saúde como teste confirmatório da LVC (Ministério da Saúde, 2014). No trabalho de Nascimento (2012) foram analisados 802 cães de áreas endêmicas, os dados da curva ROC mostraram sensibilidade entre 87,6% a 89,9%, especificidade entre 89,4% a 91,6% e acurácia variando de 0,94 a 0,92, credenciando o teste para o diagnóstico em população de cães.

Diversos trabalhos que mostram há um aumento da especificidade do teste sorológicos quando são utilizados antígenos purificados, sintéticos ou recombinantes (Akhoundi et al., 2013; Martins et al., 2015; Lage et al., 2016b). Em um trabalho realizado por Porrozi et al. (2007) foi testada a performance do teste ELISA no diagnóstico da LVC utilizando antígenos solúveis em comparação com ELISA de os antígenos recombinantes rK26 e rK39 de *L. infantum* e rA2 de *L. donovani*. Os resultados mostram que os antígenos recombinantes de *L. infantum* aumentam a sensibilidade de 88% do antígeno solúvel para 94% do rK26 e 100% do rK39 em cães sintomáticos, além do antígeno rA2 que tem a maior sensibilidade de 88% para os cães assintomáticos mostrou-se o único capaz de detectar infecção canina por outros agentes (*Leishmania braziliensis* and *Leptospira interrogans*) com especificidade de 98%. Obtendo-se uma maior confiabilidade para estes métodos sorológicos o grande problema da LV pode ser solucionado, o diagnóstico e controle do principal reservatório urbano da doença, o cão (Ministério da Saúde, 2014). O controle epidemiológico da LVC mais efetivo traz imensos benefícios à população canina e humana (Coura-Vital et al., 2013).

Os testes ELISA realizados com o peptídeo sintético da Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) frente a soroteca humana de pacientes com formas Tegumentares da Leishmaniose apresentaram resultados extremamente satisfatórios no que diz respeito a sua eficiência. Observou-se uma diminuição do *cut-off* trazendo mais precisão ao teste quando comparadas ao SLA. Houve uma distinção clara entre soros positivos e negativos, o peptídeo sintético detectou como positivos todos os soros de pacientes com LC e LMC, apresentando 100% de sensibilidade. Além de apresentar 100% de especificidade sem reações cruzada com soros de pacientes com Doença de Chagas, esta eficácia nos resultados não foi observada no teste ELISA com SLA, com sensibilidade de 97%; e baixa especificidade de 66%, havendo detecção de 10 soros de pacientes com Doença de Chagas como positivos para Leishmaniose, demonstrando assim elevado índice de reações cruzadas. O ELISA utilizando o peptídeo sintético apresentou acurácia (AUC) de 100% em contrapartida e o ELISA com SLA apresentou acurácia de 83%.

Em estudo realizado por Cataldo et al. (2010) foi comparado o desempenho do teste ELISA com uso de duas frações diferentes de antígeno de cobertura, antígeno total solúvel (SF) e antígeno fracionado da membrana (MF) de *L. braziliensis* para o diagnóstico de LTA em soros humanos. A sensibilidade encontrada foi de 89,5% para os dois antígenos e a especificidade de 89,5% para SF e 93,4% para MF, o que mostra uma maior eficiência dos antígenos de membrana quando comparados com o antígeno total de *L. braziliensis*. Tais dados apresentam-se semelhantes aos dados obtidos no presente trabalho, onde a proteína sintética aumenta a especificidade dos testes ELISA quando comparada ao ELISA de antígeno solúvel total. Porém, Cataldo et al. (2010) realiza testes apenas com soros de pacientes com LTA e soros negativos de indivíduos saudáveis não portadores de infecções similares como Doença de Chagas. Assim, não foi testada a reatividade cruzada com o gênero *Trypanosoma*, muito comum nestas infecções.

O trabalho de Weigle et al. (2002) revela que mesmo utilizando o método parasitológico, considerado padrão ouro para o diagnóstico da LT, ocorre variação da especificidade e da sensibilidade dos testes. Para os pacientes com LT aguda a PCR apresentou maior sensibilidade (75,7%) do que exame microscópico de raspagem da lesão de Giemsa (46,7%), cultura de biópsia (55,3%), cultura de aspirado (46,3%) e os métodos convencionais combinados (70,2%). Estes dados revelam uma sensibilidade baixa do PCR quando comparados da sensibilidade do teste ELISA utilizando o peptídeo sintético de *L. braziliensis* (100%) obtidos pelo presente trabalho.

Tanto na análise da Proteína Hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5 (XP_001468941.1) e quanto na análise da Proteína Hipotética de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP_001568689.1) verifica-se um melhor desempenho do ELISA aumentando a confiabilidade do diagnóstico. O uso dos peptídeos sintéticos como antígeno de cobertura do teste ELISA aumentou a sensibilidade e principalmente a especificidade do método potencializando assim seu poder de distinção de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos no diagnóstico das Leishmanioses, aumentando a eficiência desta metodologia.

Portanto este trabalho demonstrou que a metodologia proposta de análises por bioinformática se mostrou uma excelente ferramenta na busca de antígenos específicos para fins diagnósticos quando se trata da construção de epítomos conformacionais de linfócitos B.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram analisadas por Bioinformática 12 proteínas de *Leishmania* afim de predizer possíveis epítomos que possam ser utilizados no diagnóstico das Leishmanioses. O presente trabalho concluiu que a combinação de programas de bioinformática disponíveis gratuitamente na web é uma metodologia eficiente na predição de epítomos específicos para linfócitos B, sendo capaz de detectar possíveis epítomos conformacionais e assim sintetizá-los.

Os testes de reatividade dos soros contra os peptídeos sintetizados tanto de *L. infantum* como de *L. braziliensis* produzidos a partir da análise *in silico* aumentaram a sensibilidade e especificidade do teste ELISA quando comparados ao extrato total solúvel (SLA). Os peptídeos sintéticos apresentaram menor reatividade cruzada frente anticorpos de *Trypanosoma* e frente portadores de outras patologias, tanto no teste com soroteca humana quanto com soroteca canina. Além disso, o aumento da confiabilidade do teste ELISA foi confirmado por meio da curva ROC que mostrou uma maior acurácia quando foram utilizados os peptídeos sintéticos obtidos por análise combinada de Bioinformática. Pode-se concluir que a metodologia proposta por este trabalho se mostra uma ferramenta eficaz na busca bons candidatos a antígeno que possam ser utilizados no sorodiagnóstico das Leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- Akhoundi B, Mohebali M, Shojaee S, Jalali M, Kazemi B, Bandehpour M, et al. Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: Assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol*. 2013;133(3):307–13.
- Altamirano-enciso AJ. Origem Pre Historica Da Lismania. 2003;10(3):853–82.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5).
- De Arruda MM, Figueiredo FB, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JCM, de Oliveira MRF, et al. Validity and Reliability of Enzyme Immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* Antigens for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One*. 2013;8(7):8–13.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000;30(12–13):1269–81.
- Assis TSM de, Braga AS da C, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC de, Costa CHN, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde*. 2008;17(2):107–16.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis : part one. 2008;(May).
- Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(6).
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392(10151):951–70.
- Cataldo JI, Carvalho ãF, Mello DQ, Schubach ADO, Mouta-confort E, Fa M De, et al. Immunoenzymatic Assay for the Diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Using Soluble and Membrane-Enriched Fractions From Infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2010;294(June):289–94.
- CDC.No Title [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 27]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.
- Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Testasica MCS, Lage DP, Costa LE, Lage PS, et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(6):931–44.
- Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, et al. Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen , but Not by the LACK Antigen , Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. *Infect Immun*. 2003;71(7):3988–94.

Coelho EAF, Lage DP, Costa LE, Martins VT, Machado-de-Ávila RA, Ambrosio RP et al. Peptídeo conformacional, método e kit para diagnóstico da leishmaniose visceral. Brasil BR 1020160295017. 2016dez 15.

Coelho EAF, Costa LE, Salles BCS, Ramos FF, Santos TTO, Lima MP et al. Peptídeo conformacional recombinante, kit e método para diagnóstico das leishmanioses, e uso. Brasil BR 1020170136043. 2017jun 22.

Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, et al. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(1):1–10.

Costa LE, Lima MIS, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Martins VT, Duarte MC, et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. Clin Vaccine Immunol. 2014;21(1):96–106.

Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, de Leal GGA, Marques MJ, Veloso VM, et al. Risk Factors for Seroconversion by *Leishmania infantum* in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. PLoS One. 2013;8(8).

Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Costa LE, Salles BCS, Carvalho AMRS, et al. Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2017;238(November 2016):77–81.

Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol 1985 Set;55(3):836-9.

Ferreira LLG, Andricopulo AD. Chemoinformatics strategies for leishmaniasis drug discovery. Front Pharmacol. 2018;9(NOV):1–11.

Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;7210(8):419–433.

Grimaldi Jr G, Tesh RB e McMahonpratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1989;41:687-725.

Grimaldi Jr G & Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev. 1993; 6:230-250.

Hirschmann LC, Brod CS, Radin J, Simon CF, Recuero ALC. Leishmaniose Visceral Canina: Comparação de Métodos Sorológicos em Cães de Área Indene do Rio Grande do Sul no Brasil. Rev Patol Trop. 2015;44(1):33–44.

Ilg T. Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. Med Microbiol Immunol. 2001;190:13-17.

Kozlova EEG. Uso de métodos computacionais para identificação de epítomos em

metalo proteases (snake venom metallo proteases –SVMPs) e neurotoxinas (NTx) de venenos de serpentes. UFMG; 2016.

Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Garde E, Dimer LM, et al. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2016a;115(4):1649–58.

Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Tavares G de SV, Ramos FF, et al. Cross-protective efficacy of *Leishmania infantum* LiHyD protein against tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* species. *Acta Trop.* 2016b;158:220–30.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*. New York: Academy Press; 1987; p1–120.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR da, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013;196(3–4):296–300.

Lima MP, Costa LE, Duarte MC, Menezes-Souza D, Salles BCS, de Oliveira Santos TT, et al. Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol Res.* 2017;116(4):1197–206.

Lira RA de. *Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina : Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral- Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral Canina-Bio-Manguinhos*. Fundação Oswaldo Cruz; 2005.

Lunedo SN, Thomaz-Soccol V, de Castro EA, Telles JEQ. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Histochem.* 2012;114(3):252–8.

Machado-De-Avila RA, Stransky S, Velloso M, Castanheira P, Schneider FS, Kalapothakis E, et al. Peptides Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. *Peptides*.

Martins VT, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Coelho CSP, De Magalhães-Soares DF, et al. A *Leishmania*-specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against, visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors.* 2015;8(1):1–12.

Matos HJ de, Pinto AY das N, Miranda AMM, Silva FLC, Ramos FL de P. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2015;6(1):65–8.

Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Ministério da Saúde, editor. Secretaria de Vigilância em Saúde. 1ª edição. 2014;58(12):7250–7.

Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. Situação Epidemiológica da LT no Brasil, 2016. 2016;

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2017;159.

Ministério da Saúde. MS 2018 [cited 2018 Dec 20]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar/11328-situacao-epidemiologica-dados>.

Ministério da Saúde. MS 2018 [cited 2018 Dec 20]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados>.

de Moraes RCS, da Costa Oliveira CN, de Albuquerque S da CG, Mendonça Trajano Silva LA, Pessoa-e-Silva R, Alves da Cruz HL, et al. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. *Exp Parasitol*. 2016;165:43–50.

Nascimento LD. Acurácia e Confiabilidade do Ensaio Imunoenzimático produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Fundação Oswaldo Cruz; 2012.

Nicolato RDC, De Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RDDO, Reis LES, Carvalho MDG, et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One*. 2013;8(12).

Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L.-chagasi*). *Vet J*. 2014;202(3):425–35.

Oliveira E, Saliba SW, Saliba JW, Rabello A. Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107(4):243–7.

Oliveira JM de, Fernandes AC, Dorval MEC, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET, et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2):188–93.

Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*. 2013;29(7):339–45.

de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. 2015;5(1):1–10.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015;163(3–4):94–102.

Porrozzi R, Santos Da Costa M V., Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Dos Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and

recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(5):544–8.

Ravooru N, Ganji S, Sathyanarayanan N, Nagendra HG. Insilico analysis of hypothetical proteins unveils putative metabolic pathways and essential genes in *Leishmania donovani*. *Front Genet.* 2014;5.

Ribeiro RAN, Teixeira-Neto RG, Belo VS, Ferreira EC, Schallig HDFH, Silva ES. Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and Leishmune®-vaccinated dogs. *Vet Res Commun.* 2015;39(2):87–95.

Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of Isoenzymes. Suggestions for a New Classification. *Ann Parasitol Hum.* 1990;65(3):111–25.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:453-83.

Saha S, Raghava GPS. AlgPred : prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Web Server):202–9.

Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J Immunol Res.* 2017;2017.

Santos FLN, De Souza WV, Da Silva Barros M, Nakazawa M, Krieger MA, De Miranda Gomes Y. Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(5):1034–9.

Sarkari B, Rezaei Z, Mohebbali M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: Current status and challenges: A review article. *Iran J Parasitol.* 2018;13(3):331–41.

Srivastava P, Gidwani K, Picado A, Auwera G Van der, Tiwary P, Ostyn B, et al. Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India. *Trop Med Int Heal.* 2013;18(5):548–54.

Uribe-Restrepo A, Cossio A, Desai MM, Dávalos D, Castro M del M. Interventions to treat cutaneous leishmaniasis in children : A systematic review. 2018;(4):1–16.

Viol MA, Lima VMF, Aquino MCC, Gallo G, Alaves IP, Generoso D, et al. Detection of cross infections by *Leishmania spp.* and *Trypanosoma spp.* in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2012;111(4):1607–1613.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC, Icrobiol JCLINM. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):601–6.

WHO. World Health Organization. The control of leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. WHO. 2010;949(6):1–202.

WHO. World Health Organization. No Title [Internet]. WHO. 2018 [cited 2018 Dec 26]. Available from: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/

Wortmann GW, Aronson NE, Miller RS, Blazes D & Oster CN. Cutaneous leishmaniasis following local trauma: a clinical pearl. *Clin Infect Dis.* 2000; 31:199-201.

ANEXO A – SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS OBTIDAS ATRAVÉS DO GENBANK

XP_003873146.1 *Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103

1 MPVFHAVMSVEESEGVERIVPVKNRAWGLRFECASCNEKSAGMMYVNQTEQHERDGGMHN
 61 FVSKCKLCKADITADVLSVPAGTGYYSAVEENPANVIAAFEVRGGRPVELEIDNQWMIVT
 121 AGGGLFEDVDLSQEWDYDERSRATVSVAGVSVDFEKS KKK

XP_001464059.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MSAENCGNAIVRVSSNKRKFGYVDYTKHRLHEGYPEVVISALGTAIADAVSVVELLKNQG
 61 VVEVKKICTSRAQFDDVRSTTTDKIEVVVVKSPDFDAIYDQQQKDREIAKARAEADEADD
 121 E

XP_001466606.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MDRFGAGAALVSVGSSTGATCPAEAKSLKAAADGDTTGSSPDSRPAAGEPHPGGEDEASL
 61 ADTCGSVGKEADDNAVTDGNGDTEADAAGAEELSPPEEDGGQGEDAEDVVEDVGYAE
 121 EEHADEEEYEYEPEDAVIDPSATASSSSKPLMITIGTRQYKTSAFVKNRGLSYVPGKLS
 181 NPKATFQPCTTNAPHSILDCQKLHLSNRGVLVRDRFIRLNMLVDNPGKQALLRHPGRSLK
 241 MRICRRDVEPQKGETHNPATCSDLHLLPDIVFVGIPGLRTAYFEAELRHNLAFGKLKEEA
 301 WETQCGTWCRGTRSHVVTTCRFLHYNRGDNYTEKPIPPHRPLAAIPDLTPSRPAQATDSN
 361 KRARGRGRGDRGGRGRENCRGRGRGSRGAAAIPLPAAFERGYVAPSQDSAPQASSITTRA
 421 SGAENHVKSPHDALAEADWMTDNGDEGSPIDYRMLSVLLVLLGVFVFLLSVALHRKSNPA
 481 STAP

XP_001468460.1 putative translation elongation factor 1-beta [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MSLKDVSCKAAELESKLGKFLGGAKPTAEDVKVFNDLLGANHVNLWRWAKNMATYTEG
 61 ERKAWGGPVRVAPELRMPAPAAAKAVRSDAAAEKRAAPKAAAVAPPSAAAAEEDDDDDID
 121 LFGETTEEEKAALAKKAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQKLHAIQ
 181 RDGLIWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDDKVSGDDLEEMIMGFEEEVQSMDIVAWNKI

XP_001562623.1 putative endonuclease III
[*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904]

1 MSKHSFTPPSNWAQLFARLEDYRKHLLAPVDTMGCHRLHDENAPKEVQRFQTLVALMLSA
61 QTKDIVTATAMDALIKRGLTAQSIHAMTTTELDMHICKVGFHNTKVKHIKEVAAILIKDY
121 GGKVPREYEELIALPGVGPKMANLFFQDADHRTVGIGVDTHVHRISQRYRWVPSTVKTPE
181 DTRKALESWLPQKHWTINSLMVGLGQTVCTPLYPKCGICELSDICPNAFKEVQQKGLRT
241 KAPTERRQEPVPQKKRIK

XP_001466177.1 putative GTP-binding protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MQQAPSDCVASFKLILVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKRYVATVGVVDVHPLTFHTNRGKI
61 CFNCWDTAGQEKFGGLRDGYVVEGQCAIIMFDVTSRNTYKNVPNWRDITRVCDNIPIVL
121 VGNKVDCADRQVKAKMITFHRKKGLQYYDISAKSNYNFEKPFVWLAKKLANDPELMLVEV
181 PMLDTDVVALTAEQVAALEAEQQAMANAPLPMGDDE

XP_001465979.1 putative IgE-dependent histamine-releasing factor
[*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MKIFKDVLTGSEVVCNDNCPFDVEGDIMYVNGRYIDVGGEDYGISANVDEDAEAGATGE
61 VAEGKERVVDVYNNRYTETSVDKASYMAHIRSYMKQLLEKIENEEERKVFQTNAAAFVK
121 KVLKDIDEYQFFIPEGNDEDPDNGMIVLCRWDGETPRFYFWKDGLKGERV

XP_001468164.1beta-tubulin [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MREIVSCQAGQCGNQIGSKFWEVIADDEHGVDPTGSYQGSDLQLERINVYFDESAGGRYV
61 PRAVLMDLEPGTMDSVRAGPYGQLFRPDNFI FGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVLDVC
121 RKEAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISKLREEYPDRIMMFTFSVIPSPRVSDTVV
181 EPYNTTLSVHQLVENSDESMCIDNEALYDICFRTLKLTPTFGDLNHLVAAVMSGVTCCL
241 RFPGQLNSDLRKLAVNLVFPRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDAKNMM
301 QAADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSSYFIEWIPNNIKSSICDIPPKG
361 LKMSVTFIGNNTCIQEMFRRVGEQFTGMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVS
421 EYQQYQDATVEEEGEYDEEEYAY

XP_001468360.1 hypothetical protein, unknown function [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MQMQGNMYPRQMEWAVHQQPQSMQGNRQAVASRAYHLEPISTMQLRQQRGSMFGMMIGQ
61 QPGGGMMDGLSTYGPRPMIRDVQDGHMGPQQADAARAAGYGTQGMYGSHLMSYGAAGMGG
121 VNNLQNGNAALFAAGSAGQASEGNSINFNGIFNSAVNPQVQSSVAVQDDGKPLPFPPGNL
181 LAQYPPEYQQQLIFYRLLRLQYPELYQQYVDYYVMYYEPLYHPAPSSLSKDDLNGGQQR
241 KKEPLLQQTQRAHMQRQQPAMPQPGYQPPPPMEHALPSEVMCRITTSNLSGGLKRQSSLRR
301 QNSMRRNEVNQLKNEGSLKRLPSMRQQ

**XP_003873457.1 putative small myristoylated protein-3
[*Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103]**

1 MSEIKYENGQPGYSGNTVVKCFKDNGNLLFRIVNDEEHKWAFYNDTTNYQMMVKVAFGK
61 DSKIEAIGNTTMQKDEESGEFKCELEIAPTTEMFIEGEPNGFKISFEANPIAKA

ANEXO B – ANÁLISE DE SIMILARIDADE COM OUTRAS PROTEÍNAS DE *LEISHMANIA* E DE *TRYPANOSOMA* OBTIDAS PELO BLAST

XP_003873146.1 *Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	335	335	100%	2e-116	100%	XP_003873146.1
<input type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania major strain Friedlin]	320	320	100%	8e-108	94%	XP_001681647.1
<input type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania infantum JPCM5]	311	311	100%	6e-107	91%	XP_003392281.1
<input type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	260	260	95%	4e-87	81%	XP_001563094.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein ABB37_08309 [Leptomonas pyrrocoris]	226	226	99%	2e-73	63%	XP_015654219.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein ABL_78_7185 [Leptomonas seymour]	216	216	99%	1e-69	58%	KPI83769.1
<input type="checkbox"/>	unnamed_protein_product [Phytomonas sp. isolate Hart1]	132	132	99%	2e-36	35%	CCW71336.1
<input type="checkbox"/>	unnamed_protein_product [Phytomonas sp. isolate EM1]	127	127	99%	3e-34	35%	CCW64161.1
<input checked="" type="checkbox"/>	unnamed_protein_product [Trypanosoma congolense IL3000]	124	124	99%	3e-33	42%	CCD15491.1
<input type="checkbox"/>	unnamed_protein_product [Trypanosoma congolense IL3000]	124	124	99%	3e-33	42%	CCD14913.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein TM35_000321480 [Trypanosoma theileri]	121	121	99%	4e-32	43%	ORC85833.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Trypanosoma vivax Y486]	119	119	100%	2e-31	39%	CCC46509.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein_conserved [Trypanosoma brucei brucei TREU927]	114	114	99%	2e-29	41%	XP_001219037.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein_conserved [Trypanosoma brucei gambiense DAL972]	113	113	99%	6e-29	41%	XP_011771490.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein TRSC58_02948 [Trypanosoma rangeli SC58]	112	112	99%	1e-28	46%	ESL09331.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	110	110	100%	9e-28	46%	XP_820892.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	110	110	100%	1e-27	46%	XP_821972.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein AGDE_01359 [Angomonas deanei]	109	109	98%	3e-27	36%	EPY42564.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein RCY84_19388 [Trypanosoma cruzi cruzi]	108	108	100%	5e-27	45%	PBJ69691.1

XP_001464059.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania infantum JPCM5]	245	245	100%	2e-82	100%	XP_001464059.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein_conserved [Leishmania donovani]	241	241	100%	1e-80	99%	XP_003859239.1
<input type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania major strain Friedlin]	235	235	100%	3e-78	95%	XP_001681789.1
<input type="checkbox"/>	unknown [Leishmania infantum]	234	234	100%	8e-78	95%	AAK81869.1
<input type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	229	229	100%	8e-76	93%	XP_003873246.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein LPMP_130340 [Leishmania panamensis]	216	216	100%	8e-71	88%	XP_010697117.1
<input type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	216	216	100%	1e-70	88%	XP_001563170.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein ABB37_07827 [Leptomonas pyrrocoris]	203	203	99%	1e-65	83%	XP_015654973.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein ABL78_3704 [Leptomonas seymour]	198	198	99%	1e-63	81%	KPI87198.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein STCU_00164 [Strigomonas culicis]	130	130	87%	5e-37	63%	EPY37133.1
<input type="checkbox"/>	unnamed_protein_product [Phytomonas sp. isolate EM1]	130	130	81%	1e-36	68%	CCW61900.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein AGDE_05771 [Angomonas deanei]	128	128	85%	5e-36	63%	EPY38160.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein RCY84_05174 [Trypanosoma cruzi cruzi]	127	127	87%	1e-35	59%	PBJ78103.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein AGDE_08337 [Angomonas deanei]	127	127	85%	1e-35	63%	EPY33131.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	127	127	85%	2e-35	58%	XP_806326.1
<input type="checkbox"/>	unnamed_protein_product [Phytomonas sp. isolate Hart1]	124	124	81%	3e-34	64%	CCW68643.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein TM35_000302210 [Trypanosoma theileri]	121	121	77%	4e-33	62%	ORC86181.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein DQ04_03131080 [Trypanosoma pravi]	119	119	76%	3e-32	59%	XP_009310830.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein DQ04_03131070 [Trypanosoma pravi]	117	117	98%	2e-31	56%	XP_009310829.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	113	113	90%	4e-30	58%	XP_812660.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein TM35_000302220 [Trypanosoma theileri]	113	113	94%	4e-30	56%	ORC86182.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	113	113	90%	6e-30	58%	XP_806325.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein RCY84_05173 [Trypanosoma cruzi cruzi]	113	113	90%	7e-30	58%	PBJ78102.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Trypanosoma vivax Y486]	111	111	94%	3e-29	56%	CCC52974.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical_protein AGDE_05471 [Angomonas deanei]	108	108	71%	1e-28	65%	EPY38458.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein_conserved [Trypanosoma brucei gambiense DAL972]	108	108	85%	2e-28	53%	XP_011779655.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein_conserved [Trypanosoma brucei brucei TREU927]	108	108	77%	5e-28	57%	XP_828521.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved_hypothetical_protein [Trypanosoma vivax Y486]	101	101	84%	2e-25	43%	CCC52973.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical_protein_conserved [Trypanosoma brucei brucei TREU927]	96.7	96.7	80%	2e-23	56%	XP_828522.1

XP_001466606.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	993	993	100%	0.0	100%	XP_001466606.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	757	757	99%	0.0	92%	XP_003722158.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	744	744	100%	0.0	86%	XP_003872478.1
<input type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	580	580	99%	0.0	71%	XP_001566432.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein conserved [<i>Leishmania guyanensis</i>]	577	577	99%	0.0	70%	CCM17208.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein LIMP_290830 [<i>Leishmania panamensis</i>]	572	572	99%	0.0	70%	XP_010700691.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein ABL78_1070 [<i>Leptomonas seymouri</i>]	397	397	71%	1e-130	57%	KPI89807.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein XE057_04022 [<i>Leptomonas pyrrocoris</i>]	376	376	66%	1e-123	60%	XP_010686691.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate EM1]	267	267	55%	6e-81	49%	CCW59603.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate Hart1]	249	249	52%	4e-74	49%	CCW67416.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein DQ04_00731100 [<i>Trypanosoma grayi</i>]	206	206	43%	9e-57	49%	XP_009307882.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein C4B63_109408 [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	200	200	46%	5e-55	47%	PWU99041.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein BCY84_15053 [<i>Trypanosoma cruzi</i> cruzi]	200	200	46%	5e-55	47%	PBJ72798.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein MOQ_006206 [<i>Trypanosoma cruzi</i> marinkellei]	200	200	47%	5e-55	45%	EKF29992.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein TCSYLVI0_004259 [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	200	200	46%	5e-55	47%	EKG04679.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	198	198	46%	4e-54	46%	XP_810165.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	198	198	46%	4e-54	46%	XP_818119.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein TM35_000091920 [<i>Trypanosoma theileri</i>]	196	196	42%	3e-53	47%	ORC90142.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein conserved [<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927]	196	196	72%	4e-53	35%	XP_843943.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein TRSC58_03076 [<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58]	194	194	41%	8e-53	47%	ESL09207.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein conserved [<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense DAL972]	192	192	73%	7e-52	35%	XP_011772326.1
<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein fragment [<i>Trypanosoma vivax</i> Y486]	189	189	56%	5e-51	39%	CCC47104.1
<input checked="" type="checkbox"/>	unnamed protein product [<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000]	186	186	42%	1e-49	44%	CCC89789.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein TCDM_04256 [<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c]	163	163	32%	3e-43	53%	ESS67032.1

XP_001468460.1 putative translation elongation factor 1-beta [*Leishmania infantum* JPCM5]

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	469	469	100%	4e-167	100%	XP_001468460.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor 1-beta [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	437	437	100%	1e-154	95%	XP_001638175.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta putative [<i>Leishmania panamensis</i>]	342	342	100%	3e-115	80%	XP_010698286.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor 1-beta [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	338	338	100%	3e-114	80%	XP_001564363.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	335	335	100%	4e-114	81%	XP_001564367.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor 1-beta [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	335	335	100%	7e-114	83%	XP_003878670.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	337	337	100%	2e-113	83%	XP_003878672.1
<input type="checkbox"/>	putative elongation factor 1 beta [<i>Leishmania guyanensis</i>]	331	331	100%	2e-112	81%	AAV32818.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta putative (eEF1B beta 2) [<i>Leptomonas pyrrocoris</i>]	310	310	100%	5e-104	82%	XP_015660550.1
<input checked="" type="checkbox"/>	25 kDa translation elongation factor 1-beta [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	300	300	100%	1e-100	68%	XP_804306.1
<input checked="" type="checkbox"/>	25 kDa translation elongation factor 1-beta putative [<i>Trypanosoma cruzi</i> marinkellei]	300	300	100%	1e-100	68%	EKF33466.1
<input type="checkbox"/>	25 kDa translation elongation factor 1-beta [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	288	288	100%	7e-96	68%	XP_813392.1
<input checked="" type="checkbox"/>	25 kDa translation elongation factor 1-beta [<i>Trypanosoma cruzi</i> cruzi]	287	287	100%	2e-95	67%	PBJ69885.1
<input type="checkbox"/>	25 kDa translation elongation factor 1-beta [<i>Trypanosoma cruzi</i> cruzi]	286	286	100%	5e-95	67%	PBJ79035.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta putative (eEF1B beta 2) [<i>Leptomonas seymouri</i>]	287	287	100%	5e-95	78%	KPI82744.1
<input checked="" type="checkbox"/>	25 kDa translation elongation factor 1-beta putative [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	285	285	100%	1e-94	67%	EKG04985.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate EM1]	282	282	100%	5e-93	70%	CCW60543.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=25 kDa elongation factor 1-beta; Short=EF-1-beta	280	280	100%	1e-92	66%	P34827.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor 1-beta [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	278	278	85%	7e-92	81%	XP_001564361.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor 1-beta [<i>Leishmania panamensis</i>]	277	277	85%	9e-92	80%	XP_010698284.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative 25 kDa translation elongation factor 1-beta [<i>Trypanosoma grayi</i>]	269	269	100%	4e-88	72%	XP_009310126.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative 25 kDa translation elongation factor 1-beta [<i>Trypanosoma theileri</i>]	263	263	100%	1e-85	70%	ORC93493.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta [<i>Trypanosoma vivax</i> Y486]	261	261	100%	5e-85	65%	CCC47671.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate Hart1]	254	254	100%	3e-82	68%	CCW67585.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta putative [<i>Bodo saltans</i>]	248	248	98%	2e-79	68%	CUG90357.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor 1-beta [<i>Angomonas deanei</i>]	247	247	100%	2e-79	67%	EPY40274.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta putative [<i>Trypanosoma equicordum</i>]	241	241	100%	3e-77	63%	SCU66719.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta putative [<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927]	243	243	100%	3e-77	63%	XP_844509.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta putative [<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense DAL972]	244	244	100%	1e-76	67%	XP_011772945.1

<input checked="" type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta (Trypanosoma vivax Y486)	226	226	95%	1e-71	59%	CCC51528.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta (Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904)	226	226	95%	1e-71	64%	XP_001568778.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta, putative (Leishmania guyanensis)	223	223	95%	3e-70	60%	CCM19484.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta (Trypanosoma cruzi strain CL Brener)	217	217	95%	6e-68	57%	XP_818671.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta, putative (Leishmania panamensis)	217	217	95%	8e-68	60%	XP_010703063.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta (Leishmania major strain Friedlin)	215	215	95%	5e-67	65%	XP_001686715.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product (Phytomonas sp. isolate Hart1)	213	213	95%	1e-66	60%	CCW67013.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product (Phytomonas sp. isolate EM1)	211	211	95%	1e-65	61%	CCW60013.1
<input type="checkbox"/>	putative mitochondrial translation elongation factor 1-beta (Leptomonas pyrthocoris)	208	208	95%	2e-64	63%	XP_015658492.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta, putative (Trypanosoma cruzi)	208	208	99%	4e-64	54%	EKG04021.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta (Trypanosoma cruzi)	206	206	95%	1e-63	55%	PBJ75691.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta (Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103)	202	202	95%	7e-62	65%	XP_003874487.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor (Trypanosoma cruzi)	193	193	52%	1e-58	84%	AAA30183.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein (Trypanosomatidae sp. TS-2013)	190	190	95%	2e-57	55%	AGG11421.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta (Leptomonas seymouri)	189	189	95%	5e-57	61%	KPI85776.1
<input type="checkbox"/>	putative translation elongation factor 1-beta (Trypanosoma congolense IL3000)	188	188	95%	1e-56	54%	CCC93726.1
<input type="checkbox"/>	elongation factor 1-beta (Angomonas deanei)	187	187	93%	5e-56	56%	EPY25894.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta (Trypanosoma grayi)	187	187	93%	6e-56	56%	XP_009308457.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta (Trypanosoma rangeli)	187	187	99%	1e-55	55%	AGN32949.1
<input checked="" type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta (Trypanosoma theileri)	186	186	95%	1e-55	57%	ORC93060.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta, putative (Trypanosoma brucei brucei TREU927)	184	184	95%	5e-55	53%	XP_822828.1
<input type="checkbox"/>	translation elongation factor 1-beta, putative (Bodo saltans)	182	182	100%	4e-54	56%	CUG689078.1
<input type="checkbox"/>	putative elongation factor 1 beta (Leishmania donovani)	176	176	36%	2e-53	100%	AAU10517.1

XP_001562623.1 putative endonuclease III
[Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]

		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	putative endonuclease III (Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904)	543	543	100%	0.0	100%	XP_001562623.1
<input type="checkbox"/>	endonuclease III, putative (Leishmania panamensis)	533	533	100%	0.0	98%	XP_010704245.1
<input type="checkbox"/>	endonuclease III, putative (Leishmania guyanensis)	531	531	100%	0.0	98%	CCM13298.1
<input type="checkbox"/>	putative endonuclease III (Leishmania infantum JPCM5)	466	466	99%	2e-165	86%	XP_001463464.1
<input type="checkbox"/>	putative endonuclease III (Leishmania major strain Friedlin)	462	462	99%	8e-164	85%	XP_001681168.1
<input type="checkbox"/>	putative endonuclease III (Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103)	462	462	99%	2e-163	85%	XP_003872687.1
<input type="checkbox"/>	putative endonuclease III (Leptomonas pyrthocoris)	386	386	91%	3e-133	74%	XP_015655864.1
<input type="checkbox"/>	putative endonuclease III (Leptomonas seymouri)	370	370	99%	7e-127	66%	KPI83344.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III (Trypanosoma cruzi strain CL Brener)	317	317	93%	2e-106	61%	XP_807044.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III, putative (Trypanosoma cruzi)	317	317	93%	3e-106	61%	EKG02508.1
<input type="checkbox"/>	endonuclease III (Trypanosoma cruzi strain CL Brener)	317	317	93%	4e-106	61%	XP_808363.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III, putative (Trypanosoma cruzi marinkellei)	312	312	93%	2e-104	60%	EKF30968.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III (Trypanosoma rangeli SC58)	311	311	94%	4e-104	58%	ESL06290.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III (Trypanosoma theileri)	309	309	91%	4e-103	59%	ORC86049.1
<input type="checkbox"/>	endonuclease III (Strigomonas culicis)	310	310	88%	5e-103	64%	EPY33727.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative endonuclease III (Trypanosoma vivax Y486)	308	308	91%	9e-103	60%	CCC53820.1
<input checked="" type="checkbox"/>	unnamed protein product (Trypanosoma congolense IL3000)	303	303	99%	1e-100	54%	CCC95776.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III (Trypanosoma grayi)	299	299	93%	3e-99	59%	XP_009311053.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product (Phytomonas sp. isolate Hart1)	298	298	92%	1e-98	59%	CCW67020.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III, putative (Trypanosoma brucei brucei TREU927)	298	298	97%	1e-98	55%	XP_829271.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III, putative (Trypanosoma brucei gambiense DAL972)	296	296	96%	6e-98	54%	XP_011780498.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product (Phytomonas sp. isolate EM1)	286	286	94%	1e-93	56%	CCW60007.1
<input checked="" type="checkbox"/>	endonuclease III, putative, (fragment), (Trypanosoma vivax Y486)	282	282	81%	4e-93	63%	CCD18619.1

XP_001466177.1 putative GTP-binding protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

	score	score	query	value	
<input checked="" type="checkbox"/> putative GTP-binding protein [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	455	455	100%	4e-162	100% XP_001466177.1
<input type="checkbox"/> GTP-binding protein, putative [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/RR/75/M2904]	451	451	100%	1e-160	99% XP_001565706.1
<input type="checkbox"/> GTP-binding protein, putative [<i>Leishmania guyanensis</i>]	449	449	100%	5e-160	99% CCM16187.1
<input type="checkbox"/> putative mitochondrial TCTP-binding protein [<i>Leishmania</i> spp.]	413	413	100%	2e-143	90% XP_015655096.1
<input checked="" type="checkbox"/> GTP-binding nuclear protein rtb2 [<i>Trypanosoma theileri</i>]	409	409	98%	8e-144	89% ORC85762.1
<input checked="" type="checkbox"/> GTP-binding nuclear protein rtb2 [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	408	408	97%	1e-143	90% XP_814121.1
<input checked="" type="checkbox"/> GTP-binding nuclear protein rtb2, putative [<i>Trypanosoma cruzi</i> marinkellei]	406	406	99%	5e-143	88% EKF30787.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate EM1]	406	406	99%	6e-143	88% CCW63365.1
<input checked="" type="checkbox"/> GTP-binding nuclear protein rtb2 [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	409	409	98%	6e-143	89% XP_803906.1
<input checked="" type="checkbox"/> putative GTP-binding nuclear protein rtb2 [<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000]	403	403	98%	1e-141	88% CCC89621.1
<input checked="" type="checkbox"/> putative GTP-binding nuclear protein rtb2 [<i>Trypanosoma vivax</i> Y486]	401	401	98%	5e-141	87% CCC46857.1
<input checked="" type="checkbox"/> GTP-binding nuclear protein rtb2, putative [<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927]	399	399	98%	4e-140	87% XP_843708.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate Hart1]	398	398	99%	2e-139	86% CCW70946.1
<input checked="" type="checkbox"/> GTP-binding nuclear protein rtb2 [<i>Trypanosoma grayi</i>]	394	394	97%	8e-138	80% XP_009309701
<input type="checkbox"/> GTP-binding protein nuclear protein Ran [<i>Strigomonas culicis</i>]	374	374	95%	5e-130	87% EPY25499.1
<input type="checkbox"/> GTP-binding protein nuclear protein Ran [<i>Angomonas deanei</i>]	371	371	99%	4e-129	83% EPY25486.1
<input checked="" type="checkbox"/> GTP-binding protein rtb2 [<i>Trypanosoma brucei</i>]	349	349	94%	2e-120	82% AA79869.1
<input type="checkbox"/> ras-related GTP-binding nuclear protein Rth4, putative [<i>Bodo saltans</i>]	340	340	97%	1e-116	75% CUF13448.1

XP_001465979.1 putative IgE-dependent histamine-releasing factor [*Leishmania infantum* JPCM5]

	score	score	query	value	
<input checked="" type="checkbox"/> putative IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	347	347	100%	4e-121	100% XP_001465979.1
<input type="checkbox"/> putative IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	346	346	100%	1e-120	99% XP_001683667.1
<input type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor, putative [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	343	343	100%	8e-118	96% XP_003875968.1
<input type="checkbox"/> uncharacterized protein [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	336	336	100%	1e-116	96% XP_003886554.1
<input type="checkbox"/> translationally controlled tumor protein (TCTP), putative [<i>Leishmania canamensis</i>]	322	322	100%	7e-111	92% XP_010699487.1
<input type="checkbox"/> putative IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/RR/75/M2904]	319	319	100%	7e-110	91% XP_001565400.1
<input type="checkbox"/> putative mitochondrial translationally controlled tumor protein (TCTP) [<i>Leptomonas pyrrocoensis</i>]	318	318	100%	1e-109	91% XP_015655096.1
<input type="checkbox"/> putative translationally controlled tumor protein (TCTP) [<i>Leptomonas seymouri</i>]	315	315	100%	3e-108	89% KPI89209.1
<input type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Strigomonas culicis</i>]	298	298	100%	1e-101	82% EPY31477.1
<input checked="" type="checkbox"/> putative mitochondrial translationally controlled tumor protein (TCTP) [<i>Trypanosoma theileri</i>]	293	293	100%	2e-99	81% ORC88780.1
<input checked="" type="checkbox"/> translationally controlled tumor protein (TCTP) [<i>Trypanosoma theileri</i>]	290	290	100%	2e-98	79% ORC88779.1
<input type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Angomonas deanei</i>]	287	287	100%	2e-97	80% EPY36912.1
<input type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Angomonas deanei</i>]	289	289	100%	3e-97	80% EPY31663.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	286	286	100%	1e-96	79% XP_806359.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor, putative [<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense DAL972]	285	285	100%	2e-96	79% XP_011776026.1
<input checked="" type="checkbox"/> translationally controlled tumor protein (TCTP), putative [<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927]	285	285	100%	2e-96	78% XP_847505.1
<input checked="" type="checkbox"/> translationally controlled tumor protein (TCTP) [<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c]	285	285	100%	3e-96	79% ESS64861.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	282	282	100%	4e-95	78% XP_806523.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Trypanosoma rangeli</i> SC59]	276	276	100%	8e-93	76% ESL05634.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate EM1]	275	275	100%	1e-92	79% CCW62579.1
<input checked="" type="checkbox"/> unnamed protein product [<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000]	273	273	100%	2e-91	73% CCC92438.1
<input checked="" type="checkbox"/> putative IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000]	273	273	100%	1e-90	73% CCC92437.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [<i>Phytomonas</i> sp. isolate Hart1]	268	268	100%	1e-89	71% CCW65990.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor, putative [<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense DAL972]	266	266	100%	9e-89	79% XP_011776025.1
<input checked="" type="checkbox"/> putative IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Trypanosoma vivax</i> Y486]	265	265	100%	1e-88	78% CCC50031.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor, putative [<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927]	265	265	100%	2e-88	79% XP_847506.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Trypanosoma grayi</i>]	257	257	88%	1e-85	79% XP_009312670.1
<input type="checkbox"/> Hypothetical protein, putative [<i>Bodo saltans</i>]	249	249	100%	2e-82	68% CUG06302.1
<input type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor [<i>Perkinsela</i> sp. CCAP 1550/4]	182	182	100%	1e-55	54% KNH04185.1
<input checked="" type="checkbox"/> IgE-dependent histamine-releasing factor, putative [<i>Trypanosoma equiperdum</i>]	157	157	48%	4e-47	87% SCU69179.1

XP_001468164.1beta-tubulin [*Leishmania infantum* JPCM5]

<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	930	930	100%	0.0	99%	XP_003878333.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania infantum JPCM5]	930	930	100%	0.0	100%	XP_001468164.1
<input type="checkbox"/>	uncharacterized protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	928	928	100%	0.0	99%	XP_003872880.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania infantum JPCM5]	928	928	100%	0.0	99%	XP_0014683452.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania infantum]	928	928	100%	0.0	99%	SUZ45088.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	927	927	100%	0.0	99%	XP_001567883.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania major]	926	926	100%	0.0	99%	CAA83779.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania infantum JPCM5]	926	926	100%	0.0	99%	XP_0014683451.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	925	925	100%	0.0	99%	XP_001567883.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania major strain Friedlin]	925	925	100%	0.0	99%	XP_001681168.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	924	924	100%	0.0	99%	XP_003875455.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania guyanensis]	924	924	100%	0.0	99%	XP_001568153.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania guyanensis]	924	924	100%	0.0	99%	ABG81756.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania donovani]	923	923	100%	0.0	99%	AYU78428.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania trichurii JPCM5]	921	921	100%	0.0	99%	XP_0014683453.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania donovani]	921	921	100%	0.0	99%	ADJ55303.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania tarentolae]	921	921	99%	0.0	99%	ABC40587.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania donovani]	918	918	100%	0.0	99%	AFX92820.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	917	917	100%	0.0	98%	XP_001564818.1
<input type="checkbox"/>	tubulin beta [Anoplolepis deane]	914	914	100%	0.0	98%	EPY27499.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania major]	913	913	100%	0.0	98%	CAA83780.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=beta-tubulin beta chain; AltName: Full=Beta-tubulin	911	911	100%	0.0	98%	P21148.1
<input type="checkbox"/>	tubulin beta [Stenopneustes clausi]	907	907	98%	0.0	97%	EPY29918.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma theileri]	851	851	97%	0.0	96%	QRC28849.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma prayi]	850	850	97%	0.0	96%	XP_009313008.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma danilewskyi]	848	848	97%	0.0	96%	ABA00481.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Bodo saltans]	847	847	97%	0.0	95%	ACI18015.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma rangeli]	847	847	97%	0.0	96%	AGN32832.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin 1.2 [Trypanosoma cruzi]	847	847	97%	0.0	96%	AAL75956.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	845	845	97%	0.0	95%	XP_318980.1
<input type="checkbox"/>	beta-tubulin [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	842	842	90%	0.0	99%	XP_003872879.1
<input type="checkbox"/>	RecName: Full=beta-tubulin beta chain; AltName: Full=Beta-tubulin	841	841	97%	0.0	95%	P08582.2
<input checked="" type="checkbox"/>	putative beta-tubulin [Trypanosoma vivax Y426]	840	840	97%	0.0	95%	CCG46488.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma brucei brucei TREU927]	839	839	97%	0.0	95%	XP_001218833.1
<input checked="" type="checkbox"/>	unnamed protein product [Trypanosoma conopseense IL3000]	839	839	97%	0.0	95%	CCD12220.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma cruzi]	838	838	96%	0.0	95%	AA891958.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma evansi]	837	837	97%	0.0	95%	ABH05182.1
<input checked="" type="checkbox"/>	beta-tubulin [Trypanosoma evansi]	835	835	97%	0.0	94%	ACA48228.1

XP_001468360.1 hypothetical protein, unknown function [*Leishmania infantum* JPCM5]

<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein_unknown function [Leishmania infantum JPCM5]	656	656	100%	0.0	100%	XP_001468360.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein_unknown function [Leishmania donovani]	650	650	100%	0.0	98%	XP_003864139.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein LMJF_33_2990 [Leishmania major strain Friedlin]	497	497	100%	4e-175	79%	XP_001686061.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein_unknown function [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]	490	490	99%	5e-170	80%	XP_003878557.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein LPMP_333110 [Leishmania panamensis]	335	335	100%	6e-111	59%	XP_010702401.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein_unknown function [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]	334	334	100%	1e-110	60%	XP_001568093.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein_unknown function [Leishmania guyanensis]	330	330	100%	2e-109	59%	CCM18756.1

XP_003873457.1 putative small myristoylated protein-3
[*Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103]

<input checked="" type="checkbox"/>	putative small myristoylated protein-3 [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	238	238	100%	1e-79	100%	XP_003873457.1
<input type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	237	237	100%	3e-79	99%	XP_001464270.1
<input type="checkbox"/>	putative small myristoylated protein-3 [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	234	234	100%	8e-78	98%	XP_001687686.1
<input type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	220	220	100%	1e-72	91%	XP_001563372.1
<input type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	220	220	100%	2e-72	91%	XP_001563373.1
<input type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase, putative [<i>Leishmania panamensis</i>]	220	220	100%	2e-72	90%	XP_010697315.1
<input type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative [<i>Leishmania guyanensis</i>]	218	218	100%	1e-71	90%	CCM13940.1
<input type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2 [<i>Leptomonas pyrrocoris</i>]	212	212	100%	3e-69	87%	XP_015655712.1
<input type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2 [<i>Leptomonas pyrrocoris</i>]	210	210	100%	2e-68	86%	XP_015655709.1
<input type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Strigomonas culicis</i>]	202	202	99%	3e-65	83%	EPY31079.1
<input type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Strigomonas culicis</i>]	202	202	99%	1e-64	83%	EPY31224.1
<input type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2 [<i>Leptomonas seymouri</i>]	200	200	100%	2e-64	80%	KPI86380.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma vivax</i> Y486]	186	186	97%	4e-59	75%	CCC49075.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma brucei equiperdum</i>]	185	185	100%	1e-58	73%	RHW71655.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000]	184	184	99%	2e-58	74%	CCC91514.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase, putative [<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TREU927]	184	184	100%	2e-58	73%	XP_846029.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma conorthini</i>]	182	182	99%	1e-57	70%	RNF25678.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000]	182	182	99%	2e-57	72%	CCC91515.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase, putative [<i>Trypanosoma brucei brucei</i> TREU927]	181	181	99%	6e-57	71%	XP_846030.1
<input checked="" type="checkbox"/>	LOW QUALITY PROTEIN: calpain-like cysteine peptidase, putative [<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> DAL972]	187	371	99%	2e-56	74%	XP_011774816.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58]	178	178	99%	9e-56	68%	ESL08837.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	177	177	99%	1e-55	69%	XP_807299.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma cruzi</i> cruzi]	177	177	99%	1e-55	68%	PBJ69178.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener]	177	177	99%	2e-55	69%	XP_807771.1
<input checked="" type="checkbox"/>	calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma rangeli</i>]	177	177	99%	3e-55	66%	RNE99364.1
<input checked="" type="checkbox"/>	putative calpain-like cysteine peptidase [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	176	176	99%	3e-55	68%	PWW07450.1

XP_001566432.1	PWETQCGTWCRSTRSHVVTTCRFLHYNRGDNYTEKPTPPHRPLAAIPDLTPSRPPQVTDL	357
CCM17208.1	PWETQCGTWCRSTRSHVVTTCRFLHYNRGDNYTEKPTPPHRPLAAIPDLTPSRPPQVTDL	357
XP_010700691.1	PWETQCGTWCRSTRSHVVTTCRFLHYNRGDNYTEKPTPPHRPLAAIPDLTPSRPPQVTDL	357
XP_003872478.1	AWETQCGTWCRGMRSHVVTTCRFLHYNRGDNYTEKPTPPHRPLAAIPDLTPSRPPQATDS	353
XP_001466606.1	AWETQCGTWCRGTRSHVVTTCRFLHYNRGDNYTEKPTPPHRPLAAIPDLTPSRPPQATDS	359
XP_003722158.1	AWETQCGTWCRGTRSHVVTTCRFLHYNRGDNYTERPVPPHRPLAAIPDLTPSRPPQATDS	359

*****.*****:***:******.***

XP_001468460.1 putative translation elongation factor 1-beta [*Leishmania infantum* JPCM5]

XP_001568778.1	--MSTLKEINGRLNSDPFVSGFSPSSSEDARIFGEMFGSN--SNVIQWVARMASYQAEERDE	57
CCM19484.1	--MSTLKEINGRLNSDPFVSGFSPSSSEDARIFGEMFGSN--SNVIQWVARMASYQAEERDE	57
XP_010703083.1	--MSTLKEINGRLNSDPFVSGFSPSSSEDARIFGEMFGSN--SNVIQWVARMASYQAEERDE	57
XP_001686715.1	--MSTLKEVNGRLNTPDFVSGFSPSSSEDARIFNEMFGSN--SNVIQWVARMASYQAEERDE	57
XP_001469731.1	--MSTLKEVNGRLNADPFVSGFSPSSSEDARIFNEMFGSN--SNVIQWVARMASYQAEERDE	57
XP_003865264.1	--MSTLKEVNGRLNADPFVSGFSPSSSEDARIFNEMFGSN--SNVIQWVARMASYQAEERDE	57
AAV32818.1	DVSKKAAELEARLGGKFLFLGGAKPTAEDVRLNDLLGANHASLYRWVKNMATYTEGERKA	64
XP_001564367.1	DVSKKAAELEARLGGKFLFLGGAKPTAEDVRLNDLLGANHASLYRWAKNMATYTEGERKA	64
XP_001564361.1	-----MLNDLLGANHASLYRWAKNMATYTEGERKA	30
XP_003878670.1	DVSKKAAELESRLSGKFLFLGGAKPTAEDVKAFNDLLGANHSLYRWAKNMATYTEGERKA	64
XP_003878672.1	DVSKKAAELESRLSGKFLFLGGAKPTAEDVKAFNDLLGANHSLYRWAKNMATYTEGERKA	141
XP_010698286.1	DVSKKAAELEARLGGKFLFLGGAKPTAEDVRLNDLLGANHASLYRWVKNMATYTEGERKA	178
XP_003874487.1	--MSTLKEVNGRLNADPFVAGFSPSSSEDARIFSEMFG--NH--SNVIQWVARMASYQAEERDE	57
XP_001686175.1	DVSKKAAELESKLSGKFLFLGGAKPTAEDVKAFNDLLGANHSNLYRWAKNMATYAEGERKA	64
XP_001468460.1	DVSKKAAELESKLSGKFLFLGGAKPTAEDVKAFNDLLGANHSNLYRWAKNMATYTEGERKA	64
AAU10517.1	-----	0

XP_001568778.1	MISS-----GSEKLAEPAKKVAAPAP--AAAAADDDDI	89
CCM19484.1	MISS-----GSEKLAEPAKKVAAPAP--AA--ADDDGI	86
XP_010703083.1	MISS-----GSEKLAEPAKKVAAPAP--AA--ADDDGI	86
XP_001686715.1	ILN-----AGTEKKATEPAKKAAPAPA--AAAAEEDDI	91
XP_001469731.1	ILN-----AGTEKKATESAKKAAPAPA--AAAAEEDDI	91
XP_003865264.1	ILN-----AGTEKKATESAKKAAPAPA--AAAAEEDDI	91
AAV32818.1	WGAPVRTAAPELRMPAPAAAAAPAAAKKVPVPA---AAP-AAAKKPAPAPKAVAPAEEDDI	120
XP_001564367.1	WGAPVRTAAPELRMPAPAAAAAPAAAKKVPVPA---AEP-AAAKKPAPAPKAVAPAEEDDI	120
XP_001564361.1	WGAPVRTAAPELRMPAPAAAAAPAAAKKVPVPA---AEP-AAAKKPAPAPKAVAPAEEDDI	86
XP_003878670.1	WGAPVRVAAPELRMPAPAAATAAAAVSDAAAEKKAAPKAAAVAPPPAAAAAAAEEDDI	124
XP_003878672.1	WGAPVRVAAPELRMPAPAAATAAAAVSDAAAEKKAAPKAAAVAPPPAAAAAAAEEDDI	201
XP_010698286.1	WGAPVRTAAPELRMPAPAAAAAP--AAA---KK---PAPAPKA---VAPAEEDDI	221
XP_003874487.1	MLN-----AGSEKKATEPAKAT-APAPA---AAAEEDDI	88
XP_001686175.1	WGAPVRVAAPELRMPAPAA--KA--AGSDAAAEKRAAPKAAAVAPPPAA---AAE--EEDDI	117
XP_001468460.1	WGGPVRVAAPELRMPAPAAAAKA--VRSDAAEKRAAPKAAAVAPPSAA---AAEEDDDDI	119
AAU10517.1	-----	0

XP_001568778.1	DLFGETTEEEQAALAEAKKAKDAEKKKTKKDVIKSSILFDIKAWDDAVDLEALAQLLHAI	149
CCM19484.1	DLFGETTEEEQAALAEAKKAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTVDLEALAQLLHAI	146
XP_010703083.1	DLFGETTEEEQAALAEAKKAKDAVKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTVDLEALAQLLHAI	146
XP_001686715.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKEVIKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLLHAI	151
XP_001469731.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKTDVIKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLLHAI	151
XP_003865264.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLLHAI	151
AAV32818.1	GLFGETTEEEQAALAEAKRAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTVDLEALAQLLHAI	180
XP_001564367.1	DLFGETTEEEQAALAEAKRAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTVDLEALAQLLHAI	180
XP_001564361.1	DLFGETTEEEQAALAEAKRAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTVDLEALAQLLHAI	146
XP_003878670.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKAVIAKSSILFDVKAWDDTIDLEALAKKLHAI	184
XP_003878672.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKAVIAKSSILFDVKAWDDTIDLEALAKKLHAI	261
XP_010698286.1	DLFGETTEEEQAALAEAKRAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTVDLEALAQLLHAI	281
XP_003874487.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKEVIKSSILFDVKAWDDTIDLALAKKLHAI	148
XP_001686175.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKEVIKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLLHAI	177
XP_001468460.1	DLFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLLHAI	179
AAU10517.1	-----KSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLLHAI	27

* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

CAA63780.1 RKLAVNLVPLPRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 XP_001564916.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVSELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 ABC40567.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 XP_003875455.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 AYU76428.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 XP_001681156.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 ABG91756.1 RMLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 CAA63779.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 XP_001567862.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 SUZ45086.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 XP_001463452.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 XP_001468164.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 XP_003878331.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 360
 XP_003872680.1 RKLAVNLVPPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMFDKNNMQAADPRFGRY 310
 * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

CAA63780.1 LTASALFRGRMSTREVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIRSSICDIPPKGLKMSATFIGN 370
 XP_001564916.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 ABC40567.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 XP_003875455.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 AYU76428.1 LTASALFRGRISTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 XP_001681156.1 LTASALFRGRISTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSATFIGN 370
 ABG91756.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 CAA63779.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 XP_001567862.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 SUZ45086.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 XP_001463452.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 XP_001468164.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 XP_003878331.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 420
 XP_003872680.1 LTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQKNSSYFIEWLPNNIKSSICDIPPKGLKMSVTFIGN 370
 * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

XP_001468360.1 hypothetical protein, unknown function [Leishmania infantum JPCM5]

XP_010702401.1 QQQHPQCISQPFAPRAYHLEPMNALQQRQQCGGAQGMIVGQQAGGSVAGGGLPAYGPGPM 81
 CCM18756.1 QQQHPQCISQPFAPRAYHLEPMNALQQRQQCGGAQGMIVGQQAGGSVAGGGLPAYGPGPM 81
 XP_001568093.1 QQQHPQCISQPFASRAYHLEPMNALQQRQQCGGAQGMIVGQQAGGSVAGGGLPAYGPGPM 81
 XP_003878557.1 QR--MQDNLQGVASRAYHLEPISPLQTRQQGGCMPGMIVGQQPGCGVM-NGLSAYGPRPM 237
 XP_001686061.1 QS--MQGNRQAVASRAYHLEPINPLQRLRQQGSMGPMIM-QQPGGMM-DGLSAYGPRPM 77
 XP_001468360.1 QS--MQGNRQAVASRAYHLEPISTMQLRQQRGSMGPMIIGQQPGGMM-DGLSTYGRPM 78
 XP_003864139.1 QS--MQGNRQAVASRAYHLEPISTMQLRQQRGSMGPMIIGQQPGGMM-DGLSTYGRPM 78
 * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

XP_010702401.1 VRDMQNGYMNPLPAGAAIRSGAYGTHGVPGNPMGHGVAGYAAGMGGTGTSONGNPHNFTA 141
 CCM18756.1 VRDMQNGYMNPLPAGAAIRSGAYGTHGVPGNPMGHGVAGYAAGMGGTGTSONGNPHNFTA 141
 XP_001568093.1 VRDMQNGYMNPLPAGAAIRSGAYGTHGVPGNPMGHGVAGYAAGMGGTGTSONGNPHNFTA 141
 XP_003878557.1 IGDAQDGHMGPQPGDVARRATGYGTQGMHGNNMCGCP----AGMGANNLQNGNAVLFAA 293
 XP_001686061.1 VRGVQDGHMGPFPADVARRAAGDGTQGIYGNCSMSYGD----AGMGVHKLQNGHAVLLTA 133
 XP_001468360.1 IRDVQDGHMGPQQADAARRAAGYGTQGMYGSHLMSYGA----AGMGVNNLQNGNAALFAA 134
 XP_003864139.1 IRDVQDGHMGPQQADAARRAAGYGTQGMYGSHLMSYGA----AGMGVNNLQNGNAALFAA 134
 : . * : * : * . * . . * * : . * * : * . * . * * * * . * * : : *

XP_003873457.1 putative small myristoylated protein-3 [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103]

XP_003873457.1 DSKIEAIGNT **FMQKDEESGEFKCELE**FIAPTTEMFIEGEPNGFKISFEANPIAKA 115
 XP_001464270.1 DSKIEAIGNT **FMQKDEESGEFKCELE**FIAPTTEMFIEGEPNGFKISFEANPIAKA 115
 XP_001687686.1 DSKIEAIGNT **FMQKDEESGEFKCELE**FIAPTTEMFIEGEPNGFKISFEANPIAKA 115
 CCM13940.1 DSKVEPIGNT **FMQRDEESGEFKCELE**FIAPMVTEMFIEGEPNGFKISFEANPIPKA 115
 XP_001563372.1 DSKVEPIGNT **FMQRDEESGEFKCELE**FIAPMVTEMFIEGEPNGFKISFEANPIPKA 115
 XP_010697315.1 DSRVEPIGNT **FMQRDEESGEFKCELE**FIAPMVTEMFIEGEPNGFKISFEANPIPKA 115
 * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

ANEXO D – ANÁLISE COMBINADA DA PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS do ABCPRED COM A SIMILARIDADE OBTIDA PELO BLAST ENTRE AS PROTEÍNAS DE *TRYPANOSOMA*

XP_003873146.1 *Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103

XP_003873146.1	MPVFHAVMSVEESEGVERIVPVKNEAWGLRFECASCNEKSAGMMYVVTQTEQHERD-GGMH	59
ORC85833.1	MPSFRLCLS-AETEGVVRIRPTKPRNWGLKVQCEACRETS PHFYVDESEEHESGGGGTR	59
ESL09331.1	MPYFRVCLN-AETEGVVAIRPVRPFWGLKFDSCRETS PHFVYVDEREERDSGGGGTR	59
XP_820892.1	MPFFRVCLR-AETEGVLSIRPARPFWGMKFECDSRETS PHFVYVDEAEERDSGGGGTR	59
PBJ69691.1	MPFFRVCLR-AETEGVLSIRPARPFWGMKFECDSRETS PHFVYVDEAEERDSGGGGTR	59
CCC46509.1	MPLFSVRVS-AETEGVTAIRPTRPFWGLKVICDSCKEQSPHFVYVDEDEQDCSGGGGTR	59
CCD15491.1	MPQYSLLAS-AETEGVERIQPMRPFWDGWMKVECDSCREVS PNYIYVDETEERENAGGGTR	59
XP_001219037.1	MPLYRLSVS-AETEGVVCIREMPRPNWGLKVTCDACREFSPNFVYVDESEECDSGGGGTR	59
XP_011771490.1	MPLYRLSVS-AETEGVVCIREMPRPNWGLKVTCDACREFSPNFVYVDEGEEDCSGGGGTR	59

** : * : *** * * : * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * *

XP_003873146.1	DNQWMIIVTAGGGLFEDVDLSEQEWYDYDERSRATVSVAGVSVDFEKS KKK-----	161
ORC85833.1	DDKWEVE-AEGTTFRDVNLAEEDWMEYDESAGVAVSVTGANVTFHRAKTK-----	158
ESL09331.1	DDQWVVE-AEGSAFERVDLSEGWVDYDEASGAPVSVSGVSVVFERAKRTKHGEVNA	162
XP_820892.1	DGNWVVE-AEGSSFDGVDLSEEDWMEYDEASGAVVSVSGVSVVFERAKKKQHEGNA	162
PBJ69691.1	DGNWVVE-VEGSSFDGVDLSEEDWMEYDEASGAVVSVSGVSVVFERAKKKQHEGNA	162
CCC46509.1	DDRWVVS-SEGETFDGVDLSEEDWMEYDEK SATSVSVSNFTVVFARKRGK-----	160
CCD15491.1	GSNWVVV-SEGATFEGADLSEEDWMEYDEKSGTAVSVSQFEVVFHRLKKGK-----	158
XP_001219037.1	DDKWVVE-AEGATFEAADLSEEDWMEYDEKSGNAVSVSQFTVEFSRLKKS K-----	162
XP_011771490.1	DDKWVVE-AEGATFEAADLSEEDWMEYDEKSGNAVSVSQFTVEFSRLKKS K-----	162

...* : * * * * * : * : *** * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * *

XP_001464059.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

CCC52973.1	MSCKEGRTEDPTRLRVSQRRIYIYLFVKHRFHDGVTEIIVSGLGQAISDAVAVAEILK	60
XP_011779655.1	MSDKSGDSSRSQVRVSVKRRNFSYVDSIKVRLSGGKPEVTISALGKAISDAVAVAEILK	60
XP_828521.1	MSEKGGDSSRSQVRVSVKRRNFSYVDSIKVRLSGGKPEVTISALGKAISDAVAVAEILK	60
ORC86181.1	MSSSEGNPSEPIRVRVGARGNFAYVDFTKHRLHEGGPEIIISGLGRAISDAVAVAEILK	60
PBJ78103.1	MSCDAEPPSGPIQVRVGVDRNFAYVDFTKHRLHEGKPEVIITGLGRAISDAVAVAEILK	60
XP_806326.1	MSCDAEPPSGPIQVRVGVDRNFAYVDFTKHRLHEGKPEVIITGLGRAISDAVAVAEILK	60
XP_009310830.1	MAFESEKAAEPIQVRVGVKRRNFAYVDFTKHRLHEGEPEIIVSGLGRAISDAVAVAEILK	60
XP_001464059.1	MSAENC---GNAIVRVSS NRKRKFGYVDYTKHRLHEGYPEVVISALGTAIADAVSVVELLK	57
XP_828522.1	MTTGKSD-RPNRSVRVGRGTFKFLVDITKHLHDGEGEVYSALGGAINAEAVSVVEMLK	59
CCC52974.1	MTAENND-RPKNAVRVGYGTFKFLYVDITKHLHDGEGEVVISALGTAINAEAVSVVEMLK	59
ORC86182.1	MSTENTE-RPKNAVRVGHGSKFLYVDITKHLHDGQEEVVISALGKAINAEAVSVVEMLK	59
XP_009310829.1	MSAENTE-RPKNAVRVGHGSKFLYVDITKHLHDGEGEVVISALGKAINAEAVSVVEMLK	59
PBJ78102.1	MSAESAE-RPKNAVRVGHGSKFLYVDITKHLHDGEGEVVISALGKAINAEAVSVVEMLK	59
XP_812660.1	MSAENAE-RPKNAVRVGHGSKFLYVDITKHLHDGEGEVVISALGKAINAEAVSVVEMLK	59
XP_806325.1	MSAENAE-RPKNAVRVGHGSKFLYVDITKHLHDGEGEVVISALGKAINAEAVSVVEMLK	59

* : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * *

CCC52973.1	NOGLITVKRITTSQGRAPRPTKSVIHSIEILIEKAPNFDSIYDEQQRRTTEKKERVS---	117
XP_011779655.1	NOGLIDVKKITTSRGAAESDGDVANDKIEILITKSKDFDTIYAEQQKRKLENADKKE---	117
XP_828521.1	NOGLIDVKKITTSRGAAESDGDVANDKIEILITKSKDFDTIYAEQQKRKLENADKKE---	117
ORC86181.1	NOGLVVKAITTSRGSIKP-LAPLIDKIEIVVVKSKDFDSIYEEQQKRKLENAEKRESN-	118
PBJ78103.1	NOGLVTVKKITTSRGNVKSSTSVIDKIEILVVKSKDFDSIYEEQQKRKLENAEKRESN-	117
XP_806326.1	NOGLVTVKKITTSRGNVKSSTSVIDKIEILVVKSKDFDSIYEEQQKRKLENAEKRESN-	117
XP_009310830.1	NOGLVLVKRITTSRGNVKSSTSLIDKVEILVVKSKDFDTIYEEQQKRKLENAEKRESN-	117
XP_001464059.1	NO GVVEVKKICTSRAQ FDVRSSTTD KIEVVVVKSPDFDAIYDQQQKDR EIAKARAEADE	117
XP_828522.1	DOQMVVVKKITTSRQVSEEPDDGPVDKIEIVVTKADGFDKAYEEQQKAREAKRLEKEKNE	119
CCC52974.1	DOQMVTVKKISTSRGITPNRGNPVDKIEIIVTKAPGFDKAYEEQQKAREAKRLEKEKNE	119
ORC86182.1	DOQMIVVKRINTSRGGGEGTRNSTVDKIEIVVVKAPGFDKAYEEQQKAREAKRLEKEKNE	119
XP_009310829.1	DOQMVVVKKINTSRGGGEGTRNSTVDKIEIIVVTKAPGFNEKYEEQQKAREAKRLEKEKNE	119
PBJ78102.1	DOQMVLVKKISTSRGGGEGARNNTVDKIEIIVVTKAPGFNEKYEEQQKAREAKRLEKEKNE	119
XP_812660.1	DOQMVLVKKISTSRGGGEGARNNTVDKIEIIVVTKAPGFNEKYEEQQKAREAKRLEKEKNE	119
XP_806325.1	DOQMVLVKKISTSRGGGEGARNNTVDKIEIIVVTKAPGFNEKYEEQQKAREAKRLEKEKNE	119

: * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * *

XP_001466606.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

XP_843943.1	PEI-----AGAEHHHSEDSGAAMSHSEGDHREDTNGAMVSDTKSSA-----	73
XP_011772326.1	PEI-----AGAEHHHSEDSGAAMSHSEGDHREDTNGAMVSDTKSSA-----	73
XP_001466606.1	LKAAA-----DGGT-----TGS-SPDSRPAAGEPHPGGEDE	57
CCC89789.1	P-----RV--LVTASACGAGCDGVIVLGGSRAASVSSAAEPHEVQKSR	75
CCC47104.1	FDAVSDHSETTS---RNSESQV--DVGPV-AATEASVKRILVD-----	57
ORC90142.1	FKQVDTEVP-ATTAHAGEEHHS--RVDEHSSSAEEDVDPTLTDQSLQGHQ-----	105
XP_009307882.1	PSVATMRA---TATHTGEAQQT--VVDATLSRDENTERSALTERQEQQSQ-----QEAE	105
ESL09207.1	-----EDANTGLTGSQQQQQL-----E---	61
EKF29992.1	VNLGNVRVSTVVQQADGTQ-QL--PVDDALLCDCDNTKFIILTGSQQEE-----	94
XP_810165.1	VNLGNAKVSTVVEQADGTR-QL--PVDDALLCDDTGNTKVILTGSQKEE-----E---	95
EKG04679.1	VNLGNAKVSTVVKQADGTR-QL--PVDDALLCDDTGNTKVILTGLQKEE-----E---	95
PBJ72798.1	VNLGNAKVSTVVKQADGTR-QL--PVDDALLCDDTGNTKVILTGLQKEE-----E---	95
PWU99041.1	VNLGNAKVSTVVKQADGTR-QL--PVDDALLCDDTGNTKVILTGLQKEE-----E---	95
ESS67032.1	-----E-----	0
XP_843943.1	LSCKNLHLTNRAVCVKDCYLRLNTLVNPNPGKEALLVDPTSAAATALFCERTD-----ADHD	274
XP_011772326.1	LSCKNLHLTNRAVCVKDCYLRLNTLVNPNPGKEALLVDPTSAAATALFCERTD-----ADHD	274
XP_001466606.1	LDCQKLHLSNRGVLRVDRFIRLNMLVDNPGKQALLRHPGRSLKMRICRRRDVEPQKGETHN	257
CCC89789.1	INCKKLHLS CRAVRLKDCYVRLNMLVSNQAKEKLLTNPMSAAHVSLCEERA-----AGHD	261
CCC47104.1	MNCNKLHFSNRAVLGDRYVKINMLVENPAKVALITDPLSANSARFCESVA-----HSHD	243
ORC90142.1	MKCRQLHLTNRAVLIGECYVRVNMMLVDNPARQKLLTSPAAMGQTEFCSVES-----PTHD	290
XP_009307882.1	LKCPKLHLTNRAVMVGDCYVRINMLVNNPARVALLSKPSQAAGTAFCTDAD-AAGSEGH	314
ESL09207.1	MECRFLHLTNRAVLVGDRYVRINMLLDNPARVAVLKDPVSAEASFCTAAN-----GGHD	238
EKF29992.1	MECQFLHLTNRAVLVGDRYVRINMLLDNPARVALLKNPMLAAKATFCVAVD-----DGHD	256
XP_810165.1	MECQFLHLTNRAVLVGDRYVRINMLLDNPARVALLKNPMLAAKATFCTVAN-----GGHD	265
EKG04679.1	MECQFLHLTNRAVLVGDRYVRINMLLDNPARVALLKNPMLAAKATFCTVAN-----GGHD	265
PBJ72798.1	MECQFLHLTNRAVLVGDRYVRINMLLDNPARVALLKNPMLAAKATFCTVAN-----GGHD	265
PWU99041.1	MECQFLHLTNRAVLVGDRYVRINMLLDNPARVALLKNPMLAAKATFCTVAN-----GGHD	265
ESS67032.1	MECQFLHLTNRAVLVGDRYVRINMLLDNPARVALLKNPMLAAKATFCTVAN-----GGHD	55
	::* **:: *.: : : : : * *:* .: : * : *	
XP_843943.1	VTCSFVHYNRGTVYKEAPSPPALPTALFPGMQPREHVGRGRGR---NPLGRGRGA-RGRG	388
XP_011772326.1	VTCSFVHYNRGTVYKEAPSPPALPTALFPGMQPREHVGRGRGR---NPLGRGRGA-RGRG	388
XP_001466606.1	TTCRFLHYNRGDNYTEKIPPHRPLAALPDLTPSRPAQATDSNKRAR--GRGRGDRGGRG	375
CCC89789.1	VTCRFVHYNRGAVHKEISRPPDLPLAVFPALRPRAEGRVRVGVASSHCGGRGQGRGRGRG	379
CCC47104.1	VTCCKNIHYNRGGAYKEVPRIPARPLAIPSMRPRPCPATRESGPGR-----	348
ORC90142.1	VTCSFVHYNRGSAYTEVPREPSKPLALIPNMRPRGPHIVSGGDRRNNKPHSRG--RGGG	406
XP_009307882.1	VKCSFVHYNRGSTYTEAPRQPSMPLAVVPSLRPRLPRPAVSGRGRGR-GR-----GRG	425
ESL09207.1	VTCAFLHYKRGNYTEVPREPAKPLAVIPNLRPQAPRPAGGG--GGH-RCPLRG--RGRG	351
EKF29992.1	LTCAFVHYNRGKVVYTEVPREPSKPLAVIPSLRPRAPRTAGGR--GGR-GGPSRG--RGTG	369
XP_810165.1	LTCAFVHYNRGKVVYTEVPREPSRPLAVIPSLRPRAPRPTGGR--EGR-GGPSRG--RGS	378
EKG04679.1	LTCAFVHYNRGKVVYTEVPREPSRPLAVIPSLRPRAPRPAGGR--EGR-GGPSRG--RG--	376
PBJ72798.1	LTCAFVHYNRGKVVYTEVPREPSRPLAVIPSLRPRAPRPAGGR--EGR-GGPSRG--RG--	376
PWU99041.1	LTCAFVHYNRGKVVYTEVPREPSRPLAVIPSLRPRAPRPAGGR--EGR-GGPSRG--RG--	376
ESS67032.1	LTCAFVHYNRGKVVYTEVPREPSRPLAVIPSLRPRAPRPAGGR--EGR-GGPSRG--RG--	166
	. * : ** : * * : . * * * * * : * : *	

XP_001468460.1 putative translation elongation factor 1-beta [*Leishmania infantum* JPCM5]

XP_009308457.1	ELNGLRGTOPYVSGFSPSQEDAKVFSSEMFGS-HTAVIEWAARMASYYQAERDQLAKGAAS	64
CCC51528.1	ELNGLRGTOPYVAGFTPSKEDARVFSSEMFGS-NTNVMQWAARMAAAYQAERDQLGSRAS	64
AGN32949.1	ELNGLRGTOPYVAGYSPSREDAKFAEMFGS-HTAVIEWAARMASYYQAEREQLLKGAPS	104
XP_818671.1	ELNGLRSSOPYVSGYCPSQEDAKFAEMFGS-CTAVAWEAARMASYYQAEREQILKGTTS	64
EKG04021.1	ELNGLRSSOPYVSGYCPSQEDAKFAEMFGS-CTAVAWEAARMASYYQAEREQILKGTAS	91
ORC93060.1	ELNGLRTAOPYVSGFTPSQEDARVFAEMFGS-RTAVIEWAARMAAAYQAERDELAGAASS	64
XP_001468460.1	ELESKLGKLFLLGGAKPTAEDVKVFNDDLGNHVNLYRWAKNMATYTEGERKAWGGPVRV	71
SCU66719.1	KLEEKLGKLFLLGGVVKPSEEDVKAFNDDLGGDNTNVFRWVKNIASFTEAERTAWGAPVKI	71
XP_844509.1	KLEEKLGKLFLLGGVVKPSEEDVKAFNDDLGGDNTNVFRWVKNIASFTEAERTAWGAPVKI	106
XP_011772945.1	KLEEKLGKLFLLGGVVKPSEEDVKAFNDDLGGDNTNVFRWVKNIASFTEAERTAWGAPVKI	180
XP_009310126.1	ELEGKLGKLFLLGGAKPSEEDVKVFNDDLGAAGNTCVCRWVKNVASFTEAERKAWGAPVKV	71
ORC93493.1	ELESKLGKLFLLGGAKPSAEDVKVFNDDLGAAGNTCVYRWVKNMASFTEAERKAWGAPVKV	71
XP_804306.1	ELEGKLGKLFLLGGTKPSQEDVKVFNELLGAENTSLYRWVKHMASFTEAERKAWGAPVKV	71
PBJ69885.1	ELEGKLGKLFLLGGTKPSKEDVKVFNDDLGAENTSLYRWVKHMTSFTEAERKAWGAPVKV	71
EKG04965.1	ELEGKLGKLFLLGGTKPSKEDVKVFNDDLGAENTSLYRWVKHMTSFTEAERKAWGAPVKV	71
EKF33466.1	ELEGKLGKLFLLGGTKPSQEDVKVFNDDLGAENTSLYRWVKHMASFTEAERKAWGAPVKV	71
	::* : * : : * * : * * : * : : * . : : * . : : : : * * *	

ANEXO E – ANÁLISE COMBINADA ABCPRED X IEDB

XP_003873146.1 *Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103

1 MPVFHAVMSVEESEGVERIVPVKNR**AWGLRFECASCNEKSAGMMYV**NQTEQHERDGGMHN
 61 FVSKCKLCKADITADVLSVPAGTGYYSAVEENPANVIAAFEVRRGGRPVELEI**DNQWMIVT**
 121 **AGGGLF**EDVDLSQEWYDYDERSRATVSVAGVSVDFEKS

XP_001464059.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 **MSAENCGNAIVRVS**SNKRKFGYVDYTKHRLHEGYPEVVISALGTAIADAVSVVSELLKNQ**G**
 61 **VVEVKKICTSRAQ**FDDVRRSTTTDK**IEVVVVKSPDFDAIYDQQQKD**REIAKARAEADEADD
 121 E

XP_001466606.1 conserved hypothetical protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MDRFGAGAALVSVGSSTGATCPAEAKSLKAAADGDTTGSSPDS**RPAAGEPHPGGEDE**ASL
 61 ADTCGSVGKEADDNAVTDGNGDTEADAAGAEELSPPEEDGGQGEDAEDVVEDVGYAE
 121 EEHADEEEYEPEDAVADPSATASSSSKPLMITIGTRQYKTSAFVKNRGLSYVPGKLS
 181 NPKATFQPCTTNAPHSILDCQKLHLSNRGV**LVRDRFIRLNMLVDNPGKQAL**LRHPGRSLK
 241 MRICRRDVEPQKGETHNPATCSDLHLLPDI V FVGIPGLRTAYFEAELRHNLAFGKLKEEA
 301 WETQCGTWCGRTRSHVVTTCRFLHYNRGN**YTEKPIPPHRPLAA**IPDLTPSRPAQATDSN
 361 KRARGRGRGDRGGRGRENCRGRGRGSRGAAIPLPAAFERGYVAPSQDSAPQASSITTRA
 421 SGAENHVKSPHDALAEADWMTDNGDEGSPIDYRMLSVLLVLLGVFVLLSVALHRKSNPA
 481 STAP

XP_001468460.1 putative translation elongation factor 1-beta [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MSLKDVSKAAELESKLGK**LFLGGAKPTAEDVK**VFNDLLGANHV**NLYRWAKNMATYTE**G
 61 ERKAWGGPVRVAAPELRM**PAPAAAKAVRS****DAAEKRAAPKAAAVAPPSAAAAEE**DDDDID
 121 LFGETTEEKAALAKK**DAEKKKAKKDVI**AKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLHAIQ
 181 RDGLIWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDDKVSGDDLEEMIMGFEEVQSMDIVAWNKI

XP_001562623.1 putative endonuclease III [*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904]

1 MSKHSFTPPSNWAQLFARLEDYRKHLLAPVDTMGCHRLHDENAPKEVQRFQTLVALMLSA
 61 QTKDIVTATAMDALIKRGLTAQSIHAMTTTELDMHICKVGFHNTKVKHIKEVAAILIKDY
 121 GGKVPREYE**ELIALPGVGPKMAN**LFFQDADHR**TVGIGVDTHVHRIS**QRYRWPSTVKTP
 181 DTRKALESWLPQKHWTINSLMVGLGQTVCTPLYPKCGICELSDICPNAFKEVQQKGLRT
 241 KAPTERRQEPVPQKKRIK

XP_001466177.1 putative GTP-binding protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MQQAPSDCVASFKLILVGDGGT**TKTTFV**KRHLTGEF**EKRYVATVGV**DVHPLTFHT**NRGKI**
 61 **CFNCWDTA**GQEKFGGLRDGYVVEGQCAIIMFDVTSRNTYKNVNPWYRDI TRVCDNIPIVL
 121 VGNKVDCADRQVKAKMITFHRKKGLQYYDISAKSNYNFEKPFVWLAKKLANDPELMLVEV
 181 PMLD TDVVALTAEQVAALAEQQA MANAPLPMGDDE

XP_001465979.1 putative IgE-dependent histamine-releasing factor [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MKIFKDVLTGSEVVCDND**CPFDVEGDIMYVVNGRYIDVGGEDYGIS**ANVDEDAEAGATGE
 61 VAEGKERVVDVYNNRYTETS YDKASYMAHIRSYMKQLLEKIENEEERKVFQTNAAAFVK
 121 KVLK DIDEYQFFIPEGNDEDPDNGMIVLCRWDGETPRFYFWKDGLKGERV

XP_001468164.1beta-tubulin [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MREIVSCQAGQCGNQIGSKFWE**VIAD**EH**GVDP**T**GS**YQGDS**DLQLERIN**VY**FDES**AGGRY**V**
 61 **PRAVLMDLEPGT**MDSVRAGPYGQLFRPDN**FIFGQSGAGNNWA**KGHYTEGAELIDSVL DVC
 121 RKEAESDCD LQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISKLREEYPDRIMM TFSVIPSPRVSDTVV
 181 EPYNTT LSVHQLVENSDES**MCIDNEALYD**ICFR**TLKLT**TPTFGDLNHLVAAVMSGVTCC L
 241 RFPGQLNSDLRKLAVNLVFPFRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQQMF**DAKNMM**
 301 **QAADPRHGR**YLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSSYFIEWIP**NNIKSSICDI**PPKG
 361 LKMSVTFIGNNTCIQEMFRRVGEQFTGMFRRKAFLHWYTGE GMEMEFTEAESNMNDLVS
 421 EYQQYQDATVEEEGEYDEEE EAY

XP_001468360.1 hypothetical protein, unknown function [*Leishmania infantum* JPCM5]

1 MQMQGNMYPRQMEWAVHQQQPQSMQGNRQAVASRAYHLEPISTMQLRQQRGSM PGMM**IGQ**
 61 **QPGGGMDGLSTYGPRPMIRDVQDGHMGPQ**QADAARAAGYGTQGMYGSHLMSYGAAGMGG
 121 VNNLQNGNAALFAAGSAGQASEGNSINFNGIFNSAVNPQVQSSVAVQDDGKPLFP PPGNL
 181 LAQYPPEYQQQLIFYYRLLRLQYPELYQQYVDYVYMYEPLYHPAPSSLSKDDLNGGQQR
 241 KKEPLLQQTQRAHMQRQQPAMPQPGYQPPPPMEHALPSEVMCR TTSNLSGGLKRQSSLRR
 301 QNSMRRNEVNQLKNEGSLKRLPSMRQQ

XP_003873457.1putative small myristoylated protein-3 [*Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103]

1 MSEIKYENGQPGYSGNTVVKCFKDNNGLLFRIVNDEEHKWAFYNDTTNYQMMVKVAFGK
 61 DSKIEAIGNTT**MQKDEESGEFKCEL**EIAPT TTEMFIEGEPNGFKISFEANPIAKA