



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

EVALUACIÓN DEL RECEPTOR DE LA HEMOGLOBINA DEPENDIENTE DE TONB DE Bartonella bacilliformis COMO POSIBLE ANTÍGENO CANDIDATO A VACUNA

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Inga Angulo, Lisbet Roxana

Asesor Interno:

Ramses Salas Ascencio
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Asesor Externo:

Henri Bailon Calderón
(ORCID: 0000-0002-9593-6092)

Jurado:

Saez Flores, Gloria Maria
Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel
Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima - Perú

2022

Referencia:

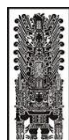
Inga, L. (2022). *Evaluación del receptor de la hemoglobina dependiente de Tonb de Bartonella bacilliformis como posible antígeno candidato a vacuna*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <https://hdl.handle.net/20.500.13084/6032>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**EVALUACIÓN DEL RECEPTOR DE LA HEMOGLOBINA DEPENDIENTE DE
TONB DE *Bartonella bacilliformis* COMO POSIBLE ANTÍGENO CANDIDATO A
VACUNA**

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Inga Angulo, Lisbet Roxana

Asesor Interno:

Ramses Salas Ascencio

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Asesor Externo:

Henri Bailon Calderón

(ORCID: 0000-0002-9593-6092J)

Jurado:

Saez Flores, Gloria Maria

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima-Perú

2022

DEDICATORIA

Esta investigación se la dedico primero a Dios por permitirme estar aquí, a mis adorados padres Norma Angulo Tuesta y Luis Inga Vilchez por su apoyo incondicional SIEMPRE (mi carrera entera se la dedico a ustedes), a mis amados hijos André y Mathías por ser mi principal fuente de motivación para seguir adelante, siendo la suma de ustedes el resultado de ser quien soy, me lo han dado todo para hacerme más fuerte y feliz, gracias por eso.

Agradecimientos

Agradezco profundamente al PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN PARA LA COMPETITIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD (Innovate Perú) por el financiamiento otorgado de acuerdo con el convenio 306-PNICP-PIAP-2015, sin el cual no hubiera sido posible realizar esta tesis. También agradezco al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS), que nos brindó las instalaciones del Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular (LBBM), totalmente equipado para cumplir con los objetivos de esta tesis de investigación.

Agradezco de manera especial y sincera a Blgo. Carlos Patricio Padilla Rojas investigador principal del proyecto “DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA PROTEÍNA MULTIEPITÓPICA COMO POTENCIAL ANTÍGENO PARA LA FORMULACIÓN DE UNA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE CARRIÓN” del (LBBM-INS), por aceptarme a realizar esta tesis en el marco de un proyecto financiado por INNOVATE-PERU/INS, ya que durante el tiempo compartido se ha convertido en mi mentor, al igual que al Ph. D. Álvaro Marcelo ya que ambos han inculcado en mí el amor por la investigación y sobre todo agradecida por haberme abiertos las puertas de sus laboratorios y depositar en mi la confianza y darme las alas para encaminar mis investigaciones. Carlos te considero un gran amigo del cual me llevo muchas enseñanzas en el ámbito académico, investigación, amical y en la vida en sí, agradeciendo siempre tu amabilidad, vocación y disposición para enseñarme y encaminarme durante mi estancia en LBBM, durante las cuales tuve todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos de esta tesis. Agradezco a todos los miembros del Laboratorio de Referencial Nacional de Biotecnología y Biología Molecular tales como Sr. Henri Bailon y Omár Cáceres por siempre escucharme, darme consejos e insumos, para encaminar y dar soluciones a los diferentes obstáculos que se fueron presentando, mi gran

estimación y admiración por la disposición que tienen por apoyar al resto de manera desinteresada y por vocación. A mi querido y gran amigo David García porque eres un GRAN técnico de laboratorio con un CORAZÓN ENORME de BIÓLOGO, eres una gran persona, de ti aprendí a no rendirme y a usar el ingenio para dar soluciones con las cosas que se tiene a la mano y con disciplina, siguiendo las reglas y cuidados que se deben tener en el laboratorio, a mi querido amigo Harrison por su apoyo en la parte logística durante y después de la culminación de mi tesis; a mis queridos amiguitos Verito, Andrés, Mary, Daian, en especial a Gaby Colque. También agradezco al grupo “*Bartonella*” Lorena, Cleidy y Astrid, ya que juntas hemos adquirido y compartido experiencias que han enrumbado nuestras investigaciones; a la Sra. Juanita por enseñarme el cuidado de la preparación de medios de cultivos, a la Dra. Gladis Ventura por sus consejos. Finalmente agradezco a mi asesor interno Blgo. Ramses Salas por su apoyo y tiempo brindado para culminar esta etapa.

Para finalizar agradezco infinitamente a mis padres por haberme heredado lo mejor que es mi educación, mis valores, principios, mi carácter, mi perseverancia y mi coraje para alcanzar mis metas, por el inmenso amor que tienen a sus hijos y nietos, por el gran ejemplo que son; a mis amados hijos por llegar a mi vida a complementarme y hacer que cada día luche por ser la mejor versión de mi; a mi querido amigo y padre de mis hijos por sus palabras de aliento en mis días más difíciles y ayudarme a que conserve la calma, gracias a todos los mencionados por formar parte de mi vida porque sé que el paso de ustedes por ella se ha llevado y ha dejado muchas enseñanzas, recuerdos y espero que lo siga haciendo.

Índice de contenido

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Descripción y formulación del problema.....	13
1.2 Antecedentes.....	14
1.3 Objetivos.....	15
• Objetivo general.....	15
• Objetivos específicos.....	15
1.4 Justificación.....	15
1.5 Hipótesis.....	17
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. Enfermedad de carrión.....	18
2.2. <i>Bartonella bacilliformis</i>.....	19
2.3. Receptores dependientes de TonB (RDTonB).....	19
2.4. Anticuerpos o Inmunoglobulinas.....	20
2.5. Antígeno.....	21
2.6. Inmunidad Humoral en la Enfermedad de Carrión.....	21
2.7 Inmunidad celular de la EC.....	22
2.8 Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y epitopes.....	22
2.9 Herramientas <i>in silico</i>.....	23
2.10 Vacunología inversa.....	23
III. MÉTODO.....	25
3.1 Tipo de investigación.....	25
3.2 Ámbito temporal y espacial.....	25
3.3 Variables.....	25
3.4 Población y muestra.....	26
3.5 Instrumentos.....	26

3.6	Procedimientos	29
	<i>3.6.1. Procedimiento bioinformático</i>	29
3.6.1.1.	Selección de la proteína de interés..	29
3.6.1.2.	Evaluación de la antigenicidad.....	30
3.6.1.3.	Predicción de epítomos de unión al CMH-I.	30
3.6.1.4.	Predicción de epítomos de unión al CMH-II.....	31
3.6.1.5.	Predicción del epítomo CTL y de las interfases TCR-peptido / péptido-CMH.	32
3.6.1.6.	Modelado por homología.	32
3.6.1.7.	Predicción de epítomos de células B.	34
3.6.1.8.	Evaluación de la alergenicidad.....	34
3.6.1.9.	Evaluación de parámetros físico-químicos.	35
	<i>3.6.2. Procedimiento experimental</i>	35
3.6.2.1.	Cultivo de <i>Bartonella bacilliformis</i>	35
3.6.2.2.	Extracción del ADN genómico..	36
3.6.2.3.	Amplificación del gen rRDTonB	36
3.6.2.4.	Digestiones del plásmido pQE31y del producto amplificado con Sal I y Bam HI	38
3.6.2.5.	Ligación de pQE31 con gen RDTonB	39
3.6.2.6.	Primera Transformación en <i>E. coli</i> Top 10 quimiocompetente	39
3.6.2.7.	Repique de colonias y PCR a partir de cultivo bacteria.....	40
3.6.2.8.	Extracción de plásmidos recombinantes por lisis alcalina.	40
3.6.2.9.	Transformación de <i>E. coli</i> BL21 PLysS DE3 con el vector recombinante pQE-31- RDTonB.....	41
3.6.2.10.	Producción de la proteína recombinante RDTonB en <i>Escherichia coli</i> BL21.	41
3.6.2.11.	Expresión en masa del gen RDTonB/pQE31 en <i>E. coli</i> BL21 PLysS DE3.	43
3.7.	Análisis de datos	44
	<i>3.7.1. Cuantificación de la proteína recombinante RDTonB mediante Bradford</i>	44
IV.	RESULTADOS	45

4.1 Análisis Bioinformático	45
4.2 Modelado de homología.....	46
4.3 Evaluación de la alergenicidad	48
4.4 Evaluación de la antigenicidad	48
4.5 Evaluación de los parámetros físico-químicos.....	49
4.6 Predicción de epítopos de unión a CMH-I, CMH-II, CTL, células B	49
4.7 Amplificación del gen RDTonB	50
4.8 Ligación de pQE31 con el gen rRDTonB.....	51
4.9 Transformación de <i>Escherichia coli</i> Top 10 con el ligando pQE31/gen RDTonB	52
4.10 Transformación del ligando pQE31/gen RDTonB en <i>Escherichia coli</i> BL21 PLysS DE353	
4.11 Producción de la proteína recombinante en <i>Escherichia coli</i> BL 21 PLysS DE3.....	54
4.12 Expresión en masa del gen rTonB/pQE31 en <i>E. coli</i> BL21 PLysS DE3.....	62
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	63
VI. CONCLUSIONES.....	65
VII. RECOMENDACIONES.....	66
VIII. REFERENCIAS	67
IX. ANEXOS	74

RESUMEN

La enfermedad de Carrión aún no ha sido erradicada del territorio peruano y es causada por la bacteria *Bartonella bacilliformis*; este estudio tiene como objetivo evaluar al receptor dependiente de TonB de la familia de transportadores de hemoglobina (RDTonB) como posible antígeno candidato a vacuna. Se utilizó un enfoque cuantitativo, tipo de investigación explorativo experimental de corte transversal, para determinar características *in silico* como: presencia de epítomos lineales y conformacionales, alergenicidad, antigenicidad, conformación estructural y orientación espacial en la membrana. Se extrajo ADN bacteriano, el cual fue sometido a PCR para la amplificación del gen de RDTonB de la cepa ATCC 35685 de *Bartonella bacilliformis*. Los productos de PCR fueron purificados y clonados en el vector pQE31, con promotor T5, en *Escherichia coli* TOP10 y expresados en *E. coli* BL21 PLysS DE3. Se demostró del análisis *in silico* que, presenta epítomos para células B y células T, es una proteína teóricamente antigénica, no es alérgica para el ser humano y presenta una conformación estructural con un dominio beta barril; siendo estas características ideales para ser considerada como antígeno candidato a vacuna. Se evidenció que es una proteína expresable en *E. coli* en condiciones de laboratorio, de naturaleza soluble con un peso de 80kDa.

Palabras clave: enfermedad de Carrión, *Bartonella bacilliformis*, receptor dependiente de TonB (RDTonB), antígeno.

ABSTRACT

Carión's disease has not yet been eradicated from Peruvian territory and is caused by the bacterium *Bartonella bacilliformis*; This study aims to evaluate the TonB-dependent receptor of the hemoglobin transporter family (RDTonB) as a possible vaccine candidate antigen. A quantitative approach, a type of cross-sectional experimental exploratory research, was used to determine *in silico* characteristics such as: presence of linear and conformational epitopes, allergenicity, antigenicity, structural conformation and spatial orientation in the membrane. Bacterial DNA was extracted, which was subjected to PCR for the amplification of the RDTonB gene from the *Bartonella bacilliformis* strain ATCC 35685. The PCR products were purified and cloned in the vector pQE31, with the T5 promoter, in *Escherichia coli* TOP10 and expressed in *E. coli* BL21 PLysS DE3. It was demonstrated from the analysis *in silico* that, it presents epitopes for B cells and T cells, it is a theoretically antigenic protein, it is not allergenic for the human being and it presents a structural conformation with a beta barrel domain; these characteristics being ideal to be considered as a candidate vaccine antigen. It was evidenced that it is an expressible protein in *E. coli* under laboratory conditions, soluble in nature with a weight of 80 kDa.

Keywords: Carrion disease, *Bartonella bacilliformis*, TonB-dependent receptor (RDTonB), antigen.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Carrión (EC) es una enfermedad metaxénica bacteriana que es causada por *Bartonella bacilliformis* y se transmite al humano por el mosquito vector *Lutzomyia verrucarum*, antes llamado *Phlebotomus verrucarum* (Pachas, 2001); se tienen indicios de que esta enfermedad era conocida por culturas precolombinas ya que contamos con manifestaciones en cerámica (Schultz, 1968) sobre la fase eruptiva caracterizada por la presencia de verrugas, pero no es hasta 1870 que se reporta el primer brote en La Oroya durante la construcción del ferrocarril (Frumdieck, 1949).

Es de mencionar que esta enfermedad se encuentra persistente en regiones endémicas asociadas a determinantes sociales como pobreza, bajo nivel educativo, factores ambientales como clima cálido, presencia del vector y de suma importancia la geografía de la cordillera de los andes. Así mismo es una enfermedad más prevalente en varones (Gray et al., 1990), siendo los más afectados niños de 0 a 11 años y adultos de 30 a 59 años (Maguiña et al., 2009; MINSA, 2019). En cuanto a mujeres embarazadas, puede provocar abortos espontáneos y nacimientos prematuros (López et al., 2006).

Por otro lado, cuando las intervenciones de control vectorial se interrumpieron en el año 2009, el número de casos aumentó en las provincias de Cutervo (Cajamarca, 2010- 2011), Pataz (La Libertad, 2011) y Huancabamba (Piura, 2011 y 2013). Por ello cabe mencionar, que la estacionalidad juega un papel importante ya que se presentó un mayor número de casos agudos después de la temporada de lluvias, cuando por lo general hay un aumento en la población del vector; mientras que, para los casos crónicos, mostraba un pico menos marcado de mayo a octubre después del pico de fase aguda (Gomes & Ruiz, 2018). La situación epidemiológica durante el periodo 2000-2018, presentó brotes esporádicos mostrando un comportamiento estacional. Hasta la semana epidemiológica número 36 del 2019 se notificaron 82 casos, 64,6% confirmados con una incidencia de 0.3 casos por cada 100 mil habitantes,

falleciendo 1 persona en el departamento de Cajamarca y otra en La Libertad (Tabla 1), esto pone en evidencia que a pesar de ser una enfermedad que lleva con nosotros más de 150 años desde su primer brote reportado no logra ser erradicada (MINSA, 2019) y lo preocupante es que se han reportado pacientes que tuvieron más de un episodio de la enfermedad, lo que muestra reincidencia del problema (Sanchez et al., 2016).

Tabla1

*Casos, incidencia y defunciones de la enfermedad de Carrión, Perú 2014-2019**

Variables	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Nro de casos	234	66	476	298	79	82
Incidencia x 100 mil hab.	0.8	0.2	1.5	0.9	0.2	0.3
Defunciones	4	1	1	8	2	2

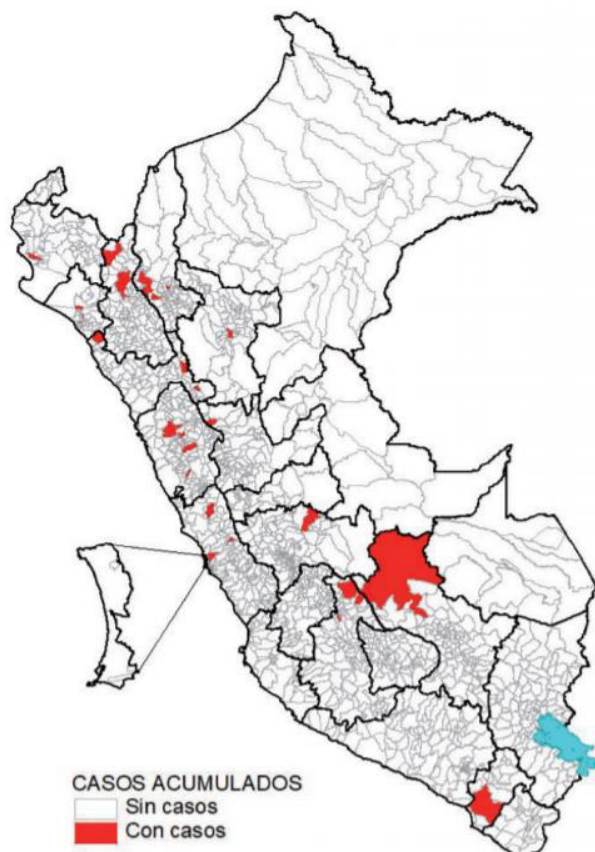
Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades-MINSA.*Hasta la SE 36 -2019

En el 2019, la enfermedad de Carrión fue reportada en los departamentos de Cajamarca, Piura, La Libertad, San Martín, Lima, Amazonas, Ancash, Ayacucho, Cusco, Huánuco, Lambayeque, Junín y Moquegua (Figura 1) (MINSA, 2019), por lo que en la actualidad sigue siendo una amenaza de salud pública afectando tanto a pobladores que viven en esas regiones como a viajeros.

Figura 1

Mapa de distribución por distritos de casos acumulados de enfermedad de Carrión, Perú 2019.

*Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades-MINSA. *Hasta la SE 36 -2019.*



A pesar de los esfuerzos por parte de nuestro país, la enfermedad de Carrión, para el 2020 ha reportado casos en 12 departamentos, 19 provincias y 26 distritos en nuestro territorio. Los distritos con mayor incidencia de casos se encuentran en Lima, Región, Ancash, Amazonas y Huánuco; siendo la forma clínica más frecuente la fase aguda, cuya principal población afectada son los niños en un 62% y el sexo más afectado es el masculino (Yon Fabián, 2021).

En consecuencia, una posible estrategia preventiva para la enfermedad de Carrión es el desarrollo de una vacuna, por lo que en este estudio se toma como objetivo principal la

evaluación de la proteína de la familia del receptor de la hemoglobina dependiente de TonB (RDTonB) de *Bartonella bacilliformis* como posible antígeno candidato a vacuna, ya que la familia es altamente conservada y se encuentran en la membrana externa, favoreciendo la posibilidad de ser reconocida por el sistema inmunitario. Este estudio empleó un enfoque alternativo *in silico* o bioinformático para acortar el tiempo y los esfuerzos a diferencia del método tradicional pero que van de la mano de la parte experimental para corroborar los hallazgos de la evaluación del antígeno candidato a vacuna (Mehla & Ramana, 2016).

1.1 Descripción y formulación del problema

Han transcurrido más de 150 años desde el primer brote reportado de la enfermedad de Carrión en 1870 y las medidas de control y prevención se ha limitado a la fumigación con DDT (dicloro-difenil-tricloroetanol) para eliminar la población del insecto vector *Lutzomia spp.* (Krumdieck, 1949)(Krueger et al., 1995); asimismo, la quimioprofilaxis con antibióticos no se acepta como medida preventiva (Maguiña, 2003). No obstante, en la actualidad no hay un método para proteger a la población de la infección del patógeno y aún se reportan casos año tras año (MINSa, 2019), es por ello que es de vital importancia diseñar una vacuna para prevenir y proteger a las personas, pero es un campo de investigación aún pendiente para la comunidad científica. Hasta el 2019 solo se ha reportado un estudio con ese objetivo (Padilla et al., 2019). Ante la problemática descrita nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Se puede considerar a la proteína de la familia del receptor de la hemoglobina dependiente de TonB de *Bartonella bacilliformis* como posible antígeno candidato a vacuna?

1.2 Antecedentes

Taye et al. en el 2005, realizaron una investigación donde lograron producir en el laboratorio la proteína recombinante Pap31 de *Bartonella bacilliformis*, donde diseñaron cebadores de PCR según la secuencia de la cepa ATCC 35685 y amplificaron el gen de un aislado local (HOSP 800 - 09, Perú). El amplicón se clonó posteriormente en pET24a, con el promotor T7 y se expresó la proteína en *E. coli*, realizándose posteriormente ensayos con suero de pacientes que reconocieron a la proteína recombinante Pap31 mediante la técnica de transferencia Western de SDS-PAGE.

Un ejemplo de las aplicaciones de una proteína recombinante es la investigación realizada por Angkasekwinai et al. (2014), donde se usó Pap31 recombinante (rPap31) en el desarrollo de una prueba serológica para la detección de anticuerpos frente a la infección por *Bartonella bacilliformis*, logrando ser efectiva para la discriminación entre individuos infectados y no infectados, mostrando ser una prueba de bajo costo y de alto rendimiento (Angkasekwinai et al., 2014).

En el país solo se ha reportado el trabajo de investigación de Padilla et al. (2019) para el diseño y evaluación de una proteína multiepítotope recombinante como candidata a vacuna para combatir la enfermedad de Carrión empleando un enfoque bioinformático y experimental con resultados alentadores.

Dentro de este marco, los autores antes mencionados nos guían hacia el camino que debemos recorrer para la evaluación de la proteína RDTonB de *Bartonella bacilliformis* como antígeno candidato a vacuna y de ese modo evaluar su respuesta humoral y celular mediante herramientas bioinformáticas para posteriormente pasar a la fase experimental donde la literatura científica pone en evidencia que es viable la expresión de una proteína recombinante

de *Bartonella bacilliformis* y las múltiples aplicaciones que se podría tener, es por esta razón que vamos a utilizar estos antecedentes para resolver la falta de un método preventivo para proteger a la población de la enfermedad de Carrión.

1.3 Objetivos

- **Objetivo general**

- Evaluar la proteína de la familia del receptor dependiente de TonB (RDTonB) de *Bartonella bacilliformis* como posible antígeno candidato a vacuna.

- **Objetivos específicos**

- ⊖ Evaluar la presencia y ubicación de epítomos de unión al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) tipo I y II en la proteína del RDTonB de *Bartonella bacilliformis* por herramientas bioinformáticas.
- Obtener la proteína recombinante del RDTonB (rRDTonB) de *Bartonella bacilliformis*.
- Optimizar la producción de la proteína recombinante del RDTonB (rRDTonB) de *Bartonella bacilliformis*.

1.4 Justificación

En Perú hasta la actualidad no se cuenta con suficientes estudios y medidas de prevención para la enfermedad de Carrión es por ello que aún no ha sido erradicada del país; el presente estudio surge de la necesidad de evaluar un antígeno candidato a vacuna del patógeno *Bartonella bacilliformis* con el propósito de proporcionar información útil a toda la

comunidad científica ya que podrían realizarse futuras investigaciones que utilizarán metodologías compatibles para mejorar el conocimiento sobre el alcance del problema y proponer a RDTonB como candidata a vacuna.

También que en la actualidad el diseño de una vacuna requiere la aplicación de herramientas bioinformáticas que ayudan a discriminar y seleccionar proteínas candidatas para vacunas experimentales, cuyos resultados sugieren que las mejores candidatas se encuentran en la superficie de las bacterias eso quiere decir que son proteínas que se encuentran insertadas en las membranas, teniendo en cuenta que el proteoma bacteriano el 25% corresponde a proteínas de membranas de los cuales solo del 2 al 3% son de membrana externa, siendo estas últimas las involucradas en la patogenicidad de la bacteria y resistencia a los antibióticos, por lo consiguiente una estrategia importante para bloquear al patógeno es generar una respuesta humoral dirigidas hacia esas proteínas de membrana externa (Abdollahi et al., 2018).

A nivel teórico la investigación es importante porque contribuirá a incrementar la información científica sobre la identificación de los epítomos de células B y T lineales y conformacionales en el RDTonB de *Bartonella bacilliformis*, ya que es uno de los pasos más cruciales para el desarrollo de vacunas antes de iniciar los procesos experimentales (Sun et al., 2019). En tal sentido usar la información generada por las herramientas bioinformáticas complementan la parte experimental.

En el nivel social, brinda un aporte al conocimiento de la comunidad; proporcionando información sobre una alternativa para combatir dicha enfermedad desde un punto de vista inmunológico y no con el suministro de antibióticos, cuyo resultado final no solo protegerá contra la enfermedad a la población de las zonas endémicas de los andes sino que también a los visitantes que llegan hacia ellas por motivos turísticos, promoviendo esta actividad de

manera segura y beneficiando económicamente a la población que también sufre problemas sociales como pobreza.

1.5 Hipótesis

El receptor dependiente de TonB de *Bartonella bacilliformis* es un antígeno candidato para producir una vacuna contra la enfermedad de Carrión.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedad de Carrión

Acercas de la enfermedad de Carrión sabemos que es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es la bacteria gram negativa *Bartonella bacilliformis*, así mismo sabemos que presenta dos fases: la fase aguda y la fase eruptiva. Hay que mencionar que la fase aguda hemática dura entre 2 a 4 semanas, iniciando la invasión del patógeno gracias a los flagelos, proteínas asociadas a la invasión y la deformina que genera hoyos en las membranas de los eritrocitos para luego multiplicarse dentro de estos trayendo como consecuencia fiebre, anorexia, malestar, náuseas y / o vómitos, palidez, hepatomegalia, adenopatías, soplo cardiaco, e ictericia. Pachas nos reporta que la enfermedad de Carrión también puede causar efectos neurológicos comprometiendo el sistema nervioso central (SNC), siendo sus efectos desde una cefalea hasta un estado de coma (Pachas, 2000; Maguiña et al., 1996). La gran mayoría de los casos confirmados son en la fase aguda y tras recibir tratamiento pueden recuperarse o fallecer, pero menos del 5%, luego de varias semanas o meses, desarrollan lesiones eruptivas sangrantes que constituyen la fase eruptiva.

A diferencia de la fase aguda, la fase eruptiva se caracteriza por la presencia de lesiones eruptivas llamadas verrugas, que se localizan en los miembros superiores e inferiores y en la cara, las cuales pueden durar sin tratamiento entre 3 a 6 meses (Ciro et al., 2008).

Es importante mencionar a la bacteremia asintomática de la enfermedad de Carrión, ya que la ausencia de signos y síntomas, pueden servir como reservorios para el vector continuando con el ciclo de transmisión; generalmente la bacteremia asintomática es detectada mediante exámenes auxiliares durante las actividades de vigilancia epidemiológica, seguimiento o investigaciones de prevalencia en las áreas endémicas (Tarazona et al., 2006).

2.2. *Bartonella bacilliformis*

Con respecto a las especies del género *Bartonella* se sabe que son bacterias intracelulares facultativas, capaces de crecer dentro de las células (Hill et al., 1992). Otro rasgo del género es que cuenta con especies que causan enfermedades para el humano, entre ellas tenemos a *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii*, y *B. grahamii* (Pachas, 2001).

Acerca de *Bartonella bacilliformis* se conoce que es una bacteria coco-bacilo gram negativo, intracelular, cuya morfología cambia según las condiciones ambientales, con dimensiones de 0.2 a 0.5 por 1 a 2 μm , de naturaleza aeróbica, no fermentativa, cuya presencia de 2 a 16 flagelos unipolares que le confieren movilidad. No obstante para ser cultivada requiere de medios sólidos enriquecidos con sangre y puede ser sembrada a partir de biopsias de lesiones eruptivas o nódulos subcutáneos, cuya temperatura óptima es 28°C con un lento crecimiento en laboratorio (Ventura & Padilla, 2006).

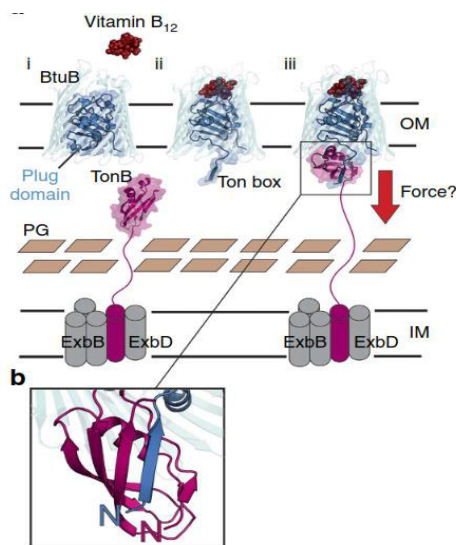
2.3. Receptores dependientes de TonB (RDTonB)

Se sabe que las proteínas de membrana constituyen un tercio de todos los proteomas bacterianos y contribuyen a una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la comunicación intercelular, el transporte de nutrientes y la generación de energía, para nuestro caso los RDTonB en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, juegan un papel esencial el transporte de hierro, sideróforos, hemo, maltosa, vitamina B12 (Figura 2) y otros nutrientes en la célula bacteriana (Abdollahi et al., 2018). Una característica estructural importante que comparten en común dichos receptores son sus dos dominios; un dominio C-terminal integrado a la membrana externa tipo β - barril el cual se encuentra sellado por un dominio N-terminal conservado globular (dominio enchufe) (Wang et al., 2016). Las proteínas de membrana pueden ser de naturaleza soluble o insoluble siendo esta última la más

complicada de expresar, purificar y caracterizar en el laboratorio es por ello que es muy importante conocer la naturaleza de las proteínas con la que estemos trabajando (Meneghini et al., 2017) .

Figura 2

Modelo de transporte de RDTonB transportando la vitamina B12 (Hickman et al., 2017)



2.4. Anticuerpos o Inmunoglobulinas

En primer lugar recordemos que los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas generadas en respuesta a la exposición de cuerpos o sustancias extrañas que ingresan dentro de organismos vertebrados, de manera que son producidos por linfocitos B ya sea para estar unidos a la membrana externa como presentadores de antígeno o secretados para neutralizar a los microbios (Abbas et al., 2018).

Es necesario recalcar que los antígenos tienen regiones específicas de unión a un anticuerpo que se denomina epítipo o determinante antigénico. La caracterización del epítipo de células B es fundamental para entender las interacciones en la respuesta humoral, por esta razón el mapeo de epítipos son los primeros pasos en el diseño de vacunas, cuyo fin es

encontrar epitopos de fuerte afinidad ya sea por difracción cristalina de rayos X, resonancia magnética nuclear o mediante herramientas *in silico* , siendo esta última el método más rápido, barato y asequible para predecirlos tanto en su forma lineal como conformacionales (Abdollahi et al., 2018).

2.5. Antígeno

Los antígenos son sustancias extrañas que al ingresar al organismo inducen una respuesta del sistema inmune, siendo de este modo reconocidas por los anticuerpos y células fagocíticas, etc. (Abbas et al., 2018). Los antígenos o sus epitopos son ampliamente utilizados para el desarrollo de vacunas, ya que su unión y afinidad con los anticuerpos determinan la eficiencia y eficacia del bloqueo de las infecciones y eliminación de los microbios, por esta razón los métodos de modelado estructural de una proteína evalúa cada región de la misma para saber si es portadora de epítopos o no (Mishra & Manish, 2018).

2.6. Inmunidad Humoral en la Enfermedad de Carrión

La inmunidad humoral es un tipo de respuesta inmunitaria adaptativa, conformado por anticuerpos los cuales son secretados por linfocitos B, constituyendo el principal mecanismo de defensa del organismo ante la presencia de antígenos iniciando por el reconocimiento y posterior neutralización de la infección para finalmente eliminarlos (Abbas et al., 2018). Se debe agregar que los primeros estudios sobre la inmunidad humoral en la EC demostraron una concentración de gammaglobulinas superior a los valores normales en sangre en pacientes en fase aguda como eruptiva. Igualmente, un estudio demostró que durante la fase aguda las IgM están marcadamente incrementadas, para luego normalizarse cuatro semanas después, contrariamente a lo que ocurre con las IgA, IgG que inicialmente presenta valores normales

para luego incrementarse. Por último durante la fase eruptiva se observa un incremento significativo de IgA, IgG e IgM (Patrucco, 1983).

2.7 Inmunidad celular de la EC

La inmunidad celular es otro tipo de respuesta inmunitaria adaptativa, donde intervienen los linfocitos T cuya misión es eliminar a los microbios que se encuentran dentro de fagocitos u otras células infectadas para de ese modo anular los reservorios de infección (Abbas et al., 2018). En tal sentido durante la fase anémica de la EC se produce una disminución de glóbulos blancos y linfocitos T pero presenta cifras normales de linfocitos B. Algo similar ocurre en ensayos *in vitro* cuando se estimula a los linfocitos de pacientes en fase anémica con agentes que son capaces de inducir la proliferación de clones de linfocitos, los cuales son factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular, observando una disminución de los linfocitos no sólo numérica sino también funcional. Desde otro punto de vista estudios realizados dos o tres semanas después de la infección mostraron un incremento de la inmunidad celular más no alcanzaron valores normales, pero en la fase eruptiva se observó valores normales de leucocitos, tendencia a la linfocitosis y valores casi normales de linfocitos T y B (Patrucco, 1983) .

2.8 Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y epitopes

El complejo mayor de histocompatibilidad son los que presentan a los antígenos (péptidos) de patógenos intracelulares (CMH I) y extracelulares (CMH II) a nuestros linfocitos T clase CD8+ y CD4+ respectivamente. El CMH cuenta con una hendidura la cual puede ligar un péptido por vez, pero esa misma hendidura puede ligar varios péptidos diferentes. Los CMH I pueden alojar péptidos de una longitud de 8 a 11 aminoácidos y los de tipo II de 10 a 30 siendo la longitud óptima de 12 a 16 aminoácidos (Abbas et al., 2018).

2.9 Herramientas *in silico*

En esta era post-genómica, se han desarrollado numerosos métodos y bases de datos que en la mayoría de los casos son de libre acceso a la comunidad científica para lograr diseñar vacunas contra diversas enfermedades que están basadas en la búsqueda de pequeñas regiones de una proteína que son reconocidos por nuestro sistema inmunitario (epítopos). A diferencia del enfoque tradicional donde se estimula el sistema inmunitario usando a todo el patógeno, las herramientas *in silico* nos ayudan a predecir esas pequeñas regiones de las proteínas (lineales y conformacionales) que interactuaran con los receptores de células B que son necesarios para activar la inmunidad humoral, también ayudan a predecir los epítopos de células T que activan la inmunidad celular. Existen herramientas *in silico* complementarias para la evaluación de un candidato a antígeno que incluyen la predicción de un posible efecto tóxico en humanos (Dhanda et al., 2016) .

2.10 Vacunología inversa

Vamos a empezar mencionando que el término "vacuna" se deriva de la vacuna Variolae, literalmente viruela de la vaca, acuñado por Edward Jenner en 1798 en un artículo que describe el efecto protector de pústula de la viruela contra la enfermedad; desde entonces las vacunas se han establecido como una de las intervenciones más eficientes y rentables para el control y la erradicación de enfermedades, y la prevención de la morbilidad y la mortalidad en todo el mundo (Doolan et al., 2014). Las vacunas son sustancias que preparan el sistema inmunitario para combatir un agente patógeno causante de enfermedades al imitar una infección, engañando al sistema inmune para que haga un "recuerdo" de ese germen sin tener que luchar contra el germen real en primer lugar. Ahora, cuando el sistema inmune encuentra

el verdadero patógeno, ya sea un virus, bacteria u otro microbio, está listo para atacarlo (Abbas et al., 2018).

La vacunología inversa hace referencia al procedimiento por el cual empleamos la información de un gen o genes elegidos dentro del genoma secuenciado de una bacteria, la cual pasa por un análisis bioinformática enfocándose en identificar las proteínas de superficie ya que se cree que la mayor parte de los antígenos vacunales candidatos se encuentran localizados en esa zona y así tener una mayor probabilidad de ser antígenos inmunitarios, en consecuencia esta información es insertada en un organismo capaz de multiplicarse con rapidez y producir antígenos experimentales como por ejemplo dentro de otros organismos procarióticos con *Escherichi coli* o eucarióticos como levaduras, como resultado pasarán por evaluaciones y ensayos para determinar si generan una respuesta inmunitaria protectora. En resumen, la vacunología inversa comienza por el mapeo genético del organismo hasta la obtención del antígeno deseado con el fin de obtener una vacuna segura y rápida para la protección de la población que la necesite (Goycochea, 2018).

III.MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

El presente trabajo consistió en evaluar *in silico* la presencia de epítomos para células B y T del receptor de la familia RD TonB de *Bartonella bacilliformis* y su producción en condiciones de laboratorio que pudieran determinar si es un candidato a vacuna contra la Enfermedad de Carrión. Es un estudio con enfoque cuantitativo, tipo de investigación explorativo experimental de corte transversal.

3.2 Ámbito temporal y espacial

La tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud Sede Chorrillos, por un periodo de nueve meses en la ciudad de Lima, Perú.

3.3 Variables

Las variables del estudio son consideradas como cuantitativas continuas.

- Variables dependientes: expresión de rRD TonB. IPTG
- Variables independientes: *Bartonella bacilliformis*, rRD TonB, *Escherichia coli*, IPTG.

3.4 Población y muestra

La población con la que se trabajó fue con 2 cepas de *Bartonella bacilliformis* la ATCC 35685 y Huancabamba que fue brindada por el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto Nacional de Salud.

3.5 Instrumentos

En el siguiente estudio se emplearon los instrumentos enlistados en la Tabla 2 con los detalles como marca, modelo y número de serie.

Tabla 2

Lista de instrumentos para el desarrollo del proyecto de tesis.

EQUIPO	MARCA	MODELO	SERIE
Congeladora Vertical -86 °C	THERMO	8606	816983-1044
Congeladora Vertical -40 °C	THERMO	729	810781-128
Área Limpia			
Congeladora Vertical -40 °C	THERMO	729	810781-130
Centrifuga	EPPENDORF	5424	5424XP320933
Refrigeradora Domestica	ELECTROLUX	DXW51	81600190
Refrigeradora Domestica	ELECTROLUX	DXW51	81600238
Agitador de Tubos	VWR SCIENTIFIC	G-560C	59298
Analizador Genetico	APPLIED	3500 xL	23332-130
Automatizado de 24 Capilares	BIOSYSTEMS		

Termociclador (Gradiente)	Corbett Research	CG1-96	C020621
Termociclador	PERKIN ELMER	Gene Amp PCR System 9700	805S0142634
Cabina de PCR Área Limpia	LABCONCO	Purifier PCR Enclosure	060656864-B
Cabina de PCR	LABCONCO	PCR ENCLOSURE	30503412
Congeladora Vertical -20 °C	Bosch	Freezer Ecoplus FB260	300023015
Cabina de Flujo Laminar	LABCONCO	Purifier Class II Biosafety Cabinet	60251210
Incubadora con Agitacion	New Brunswick Scientific Co,Inc	INNOVA 4000	101229882
Baño Maria con Agitacion	LAB-LINE	3540	1192-0082
Baño Maria Digital	VWR SCIENTIFIC	1166	92C614
Micropipeta Rango Variable 0.5 - 10 µl	EPPENDORF	Research	301448
Micropipeta Rango Variable 2 - 20 µl	GILSON	Pipetman	Z52146M
Micropipeta Rango Variable 20 - 200 µl	EPPENDORF	Research	321195
Micropipeta Rango Variable 100 - 1000 µl	Thermo	Finnpipette	CH16143
Espectrofotometro (Lector)	THERMO	NanoDrop 8000	1691

Potenciometro	HANNA Instruments	HI 2213 pH/ORP Meter	F0005171
Balanza Electronica	OHAUS	Scout II	BJ478100
Balanza Analitica	A&D INSTRUMENT LTD	GR-202-EC	14218049
Equipo para Electroforesis Horizontal 1 (Fuente de Poder)	GIBCO BRL	Model 125	174773
Equipo para Electroforesis Horizontal 1 (Camara)	GIBCO BRL	Horizon 58	237735
Campana Extractora de Gases	LABCONCO	Protector Laboratory Hood	060251690-D
Documentador de Imágenes (ChemiDoc XRS+)	BIO-RAD	Universal Hood II	721BR01546
Sonicador	COVARIS	S2	000754
Centrifuga Refrigerada	IEC	CENTRA MP4R	24382455
Equipo de Transferencia	BIO-RAD	Trans-Blot-SD	221BR-11519
Camara de Electroforesis Vertical	BIO-RAD	Mini-Protean 3 Cell	525BR-002639
Centrifuga (Mini)	VWR International	Galaxy Mini	0512-0587
Incubadora	FISHER SCIENTIFIC	637D	50200024
Incubadora Vertical	PRESICION SCIENTIFIC	815	9604-005
Microscopio	OLYMPUS	CX41RF	6D10057

3.6 Procedimientos

En primer instancia la investigación inició por la búsqueda de proteínas de membrana externa en *Bartonella bacilliformis* en la base de datos pública del NCBI (por sus sigla en inglés National Center for Biotechnology Information) para tener una mayor probabilidad de tener expuestos nuestro epítopes a la matriz extracelular esperando como resultado una mayor posibilidad de respuesta por parte del sistema inmunológico, sobre la primera base obtenida se realizó un filtro adicional para corroborar que dentro de su información aminoacídica tuviesen péptido señal el cual es un requisito indispensable para las proteínas de membrana ya que dirige su anclaje hacia dichas estructuras, dicha evaluación se hizo en la herramienta online de SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. La buscó elegir una proteína que no contara con estudios previos como antígeno candidato para vacuna contra la EC, es por ello que fue indispensable seguir afinando nuestra selección para reducir el número de candidatos.

3.6.1. Procedimiento bioinformático

3.6.1.1. Selección de la proteína de interés. En la primera etapa de la investigación, se realizó una revisión sistemática de proteínas de membrana externa de *Bartonella bacilliformis* presentes en la base de datos del NCBI y se evaluó una serie de aspectos como antigenicidad, lugar de distribución espacial en la célula, peso molecular en KDa.

3.6.1.2. Evaluación de la antigenicidad. La evaluación de la antigenicidad de las proteínas candidatas se realizó utilizando principalmente el servidor VaxiJen v2.0 en <http://www.ddgpharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>

Es el primer servidor que funciona basado en la alineamiento y la exactitud del servidor varía de 70% a 89% en base a los organismos diana, conjuntos de datos bacterianos, virales y de proteínas tumorales (Doytchinova & Flower, 2007). Otro servidor es ANTIGENpro, el cual es un predictor de la antigenicidad total de la proteína basado en secuencias, sin alineación, que predice la antigenicidad basándose en los resultados obtenidos mediante análisis de datos de microarrays de proteínas (Magan & Baldi, 2014), que está disponible en <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>. Este último se usó para la evaluación de la proteína seleccionada.

3.6.1.3. Predicción de epítomos de unión al CMH-I. Para identificar los epítomos de unión a CMH-I, se empleó dos servidores y epítomos de una longitud de 9 aminoácidos que se unen con alta afinidad al CHI-I de humanos de población peruana (HLA-A*: 01, 02, 03, 23,24, 26, 30, 31, 33, 68; HLA-B*: 07, 08, 14, 15, 18, 27, 35, 38, 39,40, 44, 48, 49, 51, 52). El servidor NetMHCpan 3.0 de predicción de péptidos de unión clase CMH-I <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/> es un servidor en línea basado en matriz que predice los sitios de unión de MHC en una secuencia peptídica (Nielsen & Andreatta, 2016).

El servidor en línea de la IEDB (por sus siglas en inglés: Immune Epitope Database and Analysis Resource) en <http://www.iedb.org/> predice los epítomos de unión al MHC mediante diferentes métodos de predicción. El método recomendado por la IEDB utiliza un método consensuado basado en redes neuronales artificiales, método de matriz estabilizada (SMM) y Bibliotecas de Péptidos Combinatorias (CombLib), si está disponible cualquier predictor correspondiente para el péptido (Vita et al., 2019).

3.6.1.4. Predicción de epítomos de unión al CMH-II. La predicción de los epítomos de unión a CMH-II se realizó con los servidores en línea NetMHCII 3.1 y IEDB. Los alelos CMH-II de humano población peruana (HLA-DR* 01, 03, 04, 07, 08, 09, 11, 13,14, 15, 16) se usarán para el análisis de unión de péptidos. El servidor NetMHCII 3.1 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/> se aplicó para predecir los epítomos de unión a clase CMH-II a partir de la secuencia de la proteína, la longitud será de 15 aminoácidos; de mismo modo para la IEDB en <http://www.iedb.org/> se empleó para predecir epítomos de unión a CMH-II utilizando diferentes métodos de predicción similares a la unión a CMH-I. La predicción se realizó de acuerdo con el método recomendado por la IEDB con la longitud de 15 aminoácidos (Wang et al., 2008).

3.6.1.5. Predicción del epítipo CTL y de las interfases TCR-péptido / péptido-CMH. CTLPred en <http://crdd.osdd.net/raghava/ctlpred/> es un método directo para la predicción de epítipos de CTL cruciales en el diseño de la vacuna de subunidades ya que usa la información o patrones de epítipos de células T, donde se basan en técnicas de aprendizaje como una red Neural Artificial y una máquina de vector de apoyo. Los métodos también permiten el consenso y la predicción combinada basada en estos dos enfoques ya que son más específicos y sensibles (Bhasin & Raghava, 2004).

La predicción se realizará de acuerdo con un método de consenso y la puntuación de corte se utilizará para discriminar los epítipos y los no epítipos. En la puntuación de corte por defecto, la sensibilidad y especificidad de los métodos de predicción son casi los mismos.

3.6.1.6. Modelado por homología. El modelo de Homología de la construcción diseñada fue llevado a cabo por el servidor Phyer2 (Proteína Homología / analogía Recognition Engine V 2.0) en <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> (Kelley et al., 2015) y el servidor I-TASSER (Iterative threading assembly refinement) en <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (Yang et al., 2015).

Phyre2 emplea la alineación de modelos ocultos de Markov para mejorar la precisión de la alineación y la tasa de detección; también utiliza métodos avanzados de detección de homología remota para construir modelos 3D, predecir sitios de unión de ligandos y analizar el efecto de variantes de aminoácidos para la secuencia de proteínas, interpretar la estructura secundaria y terciaria de sus modelos, su composición de dominio y calidad de modelo. I-TASSER utiliza una aproximación jerárquica a la estructura de la proteína y realiza la predicción basada en las múltiples alineaciones de roscado. C-score es un puntaje de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. Se calcula de acuerdo con el significado de las alineaciones de plantilla de roscado y los parámetros de convergencia de las simulaciones de ensamblaje de estructura. La puntuación-C usualmente está en el rango de [-5, 2]; el alto puntaje C está relacionado con el modelo con alta confianza y viceversa. Los programas VMD 1.8.7 se utilizaron para visualizar las estructuras 3D modeladas (Humphrey et al., 1996).

El proceso de refinamiento se realizó en dos etapas. En el primer paso, el mejor modelo 3D fue seleccionado por I-TASSER e introducido al servidor GalaxyRefine en <http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE> con el fin de refinar la proteína completa, utilizando métodos de relajación suave y agresiva. En el segundo paso, con el fin de comparar la estructura modelada con la conformación de tipo nativo, el refinamiento final del modelo se realizó utilizando la minimización de energía del potencial basado en el conocimiento de la fuerza media y la corrección estereoquímica con el servidor KobaMIN en <http://csb.stanford.edu/kobamin/> (Chopra et al., 2010).

Para reconocer los posibles errores en las estructuras predichas en 3D se utilizó el servidor ProSA-web en <http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php> (Wiederstein & Sippl, 2007) y el diagrama Ramachandran en <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>

(Lovell et al., 2003). ProSA calculó un puntaje de calidad general para una estructura 3D. La validación de la parcela de Ramachandran se basa en el cálculo de los ángulos de torsión de phi-psi para cada residuo en la estructura, y finalmente los residuos se clasifican en regiones favorecidas, permitidas y atípicas en la parcela.

3.6.1.7. Predicción de epítomos de células B. Para identificar los epítomos de células B lineales y conformacionales de la construcción final, se aplicó los servidores BCPRED y Discotope 2, respectivamente. El BCPRED en <http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html> predice epítomos de células B lineales utilizando un nuevo método de un núcleo de subsecuencia. En BCpred, se seleccionará la longitud de epítomos de 20 -mers y la especificidad por defecto del 75%.

3.6.1.8. Evaluación de la alergenicidad. Para analizar la alergenicidad de la proteína se utilizó el servidor AlgPred en <http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/> . El servidor realiza la predicción basada en seis enfoques diferentes. Uno o la combinación de los seis enfoques se puede utilizar para predecir las proteínas alergénicas con una alta precisión (Saha & Raghava, 2006). Además de AlgPred, también se utilizó el servidor web AllerTOP 1.0 en <http://www.pharmfac.net/allertop/> . El servidor se basa en la transformación de covarianza cruzada (ACC) automática de secuencias de proteínas en vectores uniformes de igual longitud. Las proteínas se clasifican por semejanza, en una base que contiene 2210 alérgenos de especies conocidas y 2210 no alérgenos de la misma especie (Dimitrov et al., 2013).

3.6.1.9. Evaluación de parámetros físico-químicos. Se calculó diferentes propiedades fisicoquímicas de la proteína candidata a vacuna, incluyendo punto isoeléctrico (pI) teórico, composición de aminoácidos, peso molecular (MW), coeficiente de extinción, índice de inestabilidad, semivida *in vitro* e *in vivo*, índice alifático y gran media de hidropatía (GRAVY) usando servidor de ProtParam en <http://web.expasy.org/proparam> (Gasteiger et al., 2005).

3.6.2. Procedimiento experimental

3.6.2.1. Cultivo de *Bartonella bacilliformis* La cepa de *Bartonella bacilliformis* ATCC 35685 fue proporcionada por el LBBM-INS; la cual fue recuperada de criopreservación, por inoculación en un frasco de cultivo bifásico compuesto de agar Columbia suplementado con 10% de sangre de carnero para la fase sólida y como fase líquida RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, los cuales fueron incubados a 28 °C por 3 a 4 semanas. Posteriormente, cada frasco de cultivo con crecimiento de colonias de *Bartonella*, fueron cosechadas de la siguiente forma: se homogenizó la fase líquida y luego se bañó la superficie de la fase sólida del medio bifásico con la fase líquida, se depositó la suspensión de las células en un vial estéril de 1.5 mL, se centrifugó a 12000 g por 5 minutos, se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se agregó 0.5 mL de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino estéril (Ventura & Padilla, 2006).

3.6.2.2. Extracción del ADN genómico: En el caso de *Bartonella bacilliformis* se realizó a partir de 1 tubo de cultivo bifásico; todas las extracciones fueron realizadas a partir de cultivos frescos incubados que fueron cosechados y se los colocados en un vial de 1.5 mL; se centrifugó a 1200 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Al sedimento celular se le agregó 600 µL de solución de lisis, se mezcló usando un vórtex hasta la completa resuspensión de las células. Posteriormente el ADN genómico fue purificado usando un kit comercial Qiagen DNA EASY purification kit (QIAGEN) dentro de una cabina de flujo laminar, utilizando en todo momento material nuevo y estéril usando procedimientos recomendados por el fabricante. Las muestras de ADN fueron cuantificadas por espectrofotometría y almacenadas a -20 °C hasta su uso. Para verificar la pureza e integridad del DNA genómico, todas las muestras de DNA fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% corridas a 120 voltios por 1 hora en buffer de TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), los geles fueron fotografiados por el equipo documentador de imágenes (Chemidoc XRS, de marca Bio-Rad). Para realizar posteriormente los ensayos de PCR para la clonación del gen de nuestra proteína se seleccionó las mejores extracciones de ADN genómico.

3.6.2.3. Amplificación del gen rRDTonB : Se diseñó cebadores de PCR con la ayuda del servidor IDT Oligo Analyzer <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> y se eligió las enzimas de resticción BamHI (5'-GGATCC-3') y Sall (5'GTCGAC 3') para poder incluir las secuencias en el diseño Tabla 3, donde se ha sombreado los sitios de corte para la secuencia de *Bartonella bacilliformis* para amplificar el gen que codifica la proteína de la familia del receptor de la hemoglobina dependiente de TonB.

Tabla 3*Secuencias de primers utilizadas en el estudio.*

Gen	Nombre del Primer	Secuencia	Tm	Producto de PCR esperado
RDTon B	F-RDTonB	tttttggatcctAGATCCTTCAAGCACAGTAACA	56.8	2017 pb
	R-RDTonB	tttttgcgaggAAATTTTTGTACGAATGACACCTT AAAGC	60.8	

 ADN de *Bartonella bacilliformis* ATCC con una concentración de 60 ng/ μ L

Para amplificar el gen RDTonB se utilizó 5 μ L de buffer de amplificación 10X (High Fidelity PCR), 2.5 μ L de 50 mM cloruro de magnesio, 4 μ L de 10 mM nucleótidos para PCR, 5 μ L de 10 μ M primer INS1, 5 μ L de 10 μ M primer INS1, 2 U del ADN polimerasa termoestable de alta fidelidad Platinum High Fidelity (Invitrogen Inc, USA) y 60 ng de ADN purificado de *B. bacilliformis*, el volumen final de la reacción fue de 50 μ L. Las condiciones de amplificación fueron una denaturación inicial 95°C por 2 minutos, luego 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos (temperatura de hibridación de los primers referencial) y 72°C por 2 minutos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Con la finalidad de optimizar el producto de amplificación se realizó un ensayo con las siguientes temperaturas de hibridación: 51°C; 52°C; 54,1°C; 56°C; 57,9°C; 60°C; 62°C; 58,9°C para elegir la temperatura de hibridación óptima.

3.6.2.4. Digestiones del plásmido pQE31y del producto amplificado con Sal

I y Bam HI: El plásmido pQE-31 y el producto amplificado por PCR que contiene nuestro gen fueron digeridos de manera secuencial con las enzimas de restricción Sal I y Bam HI. En primer lugar, se digirió el plásmido pQE-31 (1,5 µg) y el producto de amplificación (1µg) usando buffer de restricción D 1X (6 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1mM DTT, pH 7.9) y 50 U de la enzima de restricción Sal I en un volumen final de 50 µL. Estas reacciones fueron incubadas por 12 horas a 37°C. La correcta digestión del plásmido y el producto de amplificación fue demostrada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se purificó el plásmido y el producto de amplificación usando el kit PureLink PCR purification (Invitrogen Inc. USA) siguiendo las indicaciones de los fabricantes y se procedió a realizar la segunda digestión con las enzimas Bam HI. Para ello el plásmido pQE-31 y el producto amplificado previamente digeridos con *Sal* I fueron mezclados con buffer de restricción E 1X (6 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.5) y 50 U de la enzima de restricción Bam HI en un volumen final de 50 µL. Estas reacciones fueron incubadas por 12 horas a 37 °C. La correcta digestión del plásmido y el producto de amplificación fue demostrada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.6.2.5. Ligación de pQE31 con gen RDTonB: Para calcular la cantidad de plásmido e inserto necesarios para una ligación se utilizó el programa NEBIO calculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). Para realizar la ligación se utilizó buffer de ligación 1X, 22.48 ng de plásmido pQE-31 digerido con *Sal I/Bam* HI purificado, 84.7 ng de inserto digerido *Sal I/Bam* HI purificado y T4 ligasa en un volumen de reacción de 10 L. También se hizo una reacción similar donde no se incluyó el inserto como control de autoligación. Estos tubos de reacción se incubaron entre 4 a 8°C por 12 horas. Para verificar la correcta ligación se digirió con las enzimas de restricción y luego se purificaron con el kit de purificación Invitrogen según las indicaciones del fabricante siendo cuantificadas en Nanodrop para conocer las concentraciones.

3.6.2.6. Primera Transformación en *E. coli* Top 10 quimiocompetente: La cepa bacteriana de *E. coli* Top 10 quimiocompetente fue transformada con la reacción de ligación del plásmido pQE-31 con el inserto y con el control de autoligación. Para ello, se mezcló una alícuota de 90 µL de células competentes *E. coli* Top10 quimiocompetente con 5 µL de la reacción de ligación y se incubó en hielo por 30 minutos para luego realizar un pulso de calor de 42°C por 90 segundo usando baño maría y un minuto en hielo; seguidamente se añadió 900 µL de medio SOC y se procedió a incubar 1 hora a 37°C con 220 rpm de agitación usando un shaker. Se centrifugó las células a 6000 rpm por 2 minutos, se resuspendió en 100 µL de medio SOC, se plaqueo por extensión en placas de agar LB suplementado con ampicilina y se incubó a 37°C durante 16 horas.

3.6.2.7. Repique de colonias y PCR a partir de cultivo bacteria: Luego de la transformación, para corroborar que las colonias crecidas en nuestra placa contienen el plásmido ligado al inserto, se inoculó cada colonia en 3 mL de medio LB suplementado con ampicilina. Estos inóculos fueron incubados por 16 horas a 37 °C con agitación. Luego, se realizó PCR según las condiciones ya estandarizadas para amplificar el gen del receptor relacionado a TonB utilizando como ADN target 1 µL de cultivo de cada clona. La amplificación del inserto fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.6.2.8. Extracción de plásmidos recombinantes por lisis alcalina: Se transfirió 1.5 mL de cultivo a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 6000 g por 5 minutos descartando el sobrenadante. Luego se añadió 100 µL de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Hcl, 10 mM EDTA, pH 8.0) al pellet y se resuspendió con un vortex dejando reposar 5 minutos, seguidamente se agregó 200 µL de Solución II (0.1 M NaOH, 1% SDS) el cual se preparó en el momento se homogenizó y se agregó 150 µL de buffer III (3 M acetato de potasio) mezclado cuidadosamente por inversión incubando por 15 minutos en hielo, se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El plásmido recombinante presente en el sobrenadante fue purificado utilizando el kit PureLink PCR Purification (Invitrogen, Inc, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, analizando finalmente ADN plasmídico purificado mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

3.6.2.9. Transformación de *E. coli* BL21 PLysS DE3 con el vector recombinante pQE-31-RDTonB. Para la expresión de la proteína RDTonB se transformó 90 μ L de células competentes *E. coli* BL21PLysS DE3 con plásmido purificado de acuerdo al mismo procedimiento para transformación previamente descrito líneas arriba. Para demostrar la presencia de plásmidos recombinantes en las clonas de *E. coli* BL21 pLysS DE3 obtenidas se procedió como se describió anteriormente mediante PCR de cultivos.

3.6.2.10. Producción de la proteína recombinante RDTonB en *Escherichia coli* BL21: El plásmido pQE-31 está diseñado para la expresión de proteínas recombinantes utilizando el promotor del bacteriófago T5. La expresión se indujo con IPTG, el cual remueve al represor del operador para que se lleve a cabo la transcripción. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó cultivando las colonias de *E. coli* BL21 inicialmente en medio LB, OD 1, 37°C, 3 mM IPTG, agitación a 220 rpm.

Se realizó una purificación en condiciones nativas o solubles que consistió en añadir 1mL de cultivo inducido a un vial de microcentrífuga y se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos eliminando el sobrenadante, luego se añadió 100 μ L de buffer de lisis y se mezcló usando el vortex añadiendo 4 μ L de lisozima (30mg/mL) se incubó 30 minutos en hielo, seguidamente se realizó 4 ciclos de shock térmico de -80°C por 15 minutos y 37°C por 5 minutos y se centrifugó a 15000g por 10 minutos, transfiriendo el sobrenadante a otro tubo, para la recuperación de la proteína recombinante que tiene una cola de histidina, se añadió 20 μ L de resina Ni-NTA al 50% al tubo donde se transfirió el sobrenadante(10 μ L de resina capta 50-100 μ g de proteína con cola de histidina), se incubó por 2 horas con movimiento constante a 4°C, pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 1000g por 10 minutos, se transfirió 10 μ L de sobrenadante para nuestro control en un tubo nuevo y se mantuvo en hielo , el resto del

sobrenadante fue descartado. Se añadió 100µL de buffer de lavado y se centrifugó a 1000g por 10 minutos realizando este paso dos veces conservando 10µL del sobrenadante para el control. Finalmente se añadió 20µL de buffer de elusión (100mM de Imidazol) se repitió este paso tres veces centrifugando a 1000g por 10 minutos.

Para la purificación de la proteína en condiciones insolubles o denaturantes se utilizó el pellet restante de la primera purificación se añadió 100 µL de buffer de lisis mezclado en un vortex, luego se añadió 4 µL de lisozima (30mg/mL), se colocaron en hielo 30 minutos. Seguidamente se realizaron 4 ciclos de shock térmico de -80°C durante 15 minutos y 37°C durante 5 minutos para luego ser centrifugado a 15000g por 10 minutos a 4°C; se transfirió el sobrenadante a otro tubo donde se añadió 20µL de resina de Ni-NTA al 50% , se incubó por 2 horas con movimiento constante a 4°C, pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 15000g por 10 segundos, se transfirió 10µL del sobrenadante en un tubo nuevo y se mantuvo en hielo para luego eliminar el resto del sobrenadante, se agregó 250µL de buffer C de lavado y se centrifugó por 10 segundos a 1000g realizando este proceso dos veces pero conservando 10µL del sobrenadante para el control. Finalmente se añadió 25µL de buffer E de elusión (100mM de Imidazol) se repitió tres veces este paso y se centrifugó a 15000g por 10 segundos y los eluidos fueron guardados a -20°C hasta su uso.

Se tomó 10 µL de muestra de proteína obtenida junto a los controles recolectados durante el proceso de purificación, se corrió una electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida 10% a 120V durante 120 minutos y se detuvo cuando el marcador azul de bromofenol alcance el extremo del gel. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.15 por ciento.

Para un mejor rendimiento de la producción de la proteína recombinante se realizó múltiples ensayos consecutivos hasta obtener las condiciones finales para una posterior inducción en masa.

3.6.2.11. Expresión en masa del gen RDTonB/pQE31 en *E. coli* BL21 PLysS

DE3: Se realizó una inducción en masa con las condiciones finales de la expresión de la proteína recombinante del gen rTonB/pQE31 en *E. coli* BL21 PLysS DE3 las condiciones finales fueron 25°C, 0.25 mM IPTG, 5 horas, OD 1, medio de cultivo TB, 220 rpm de agitación. La inducción en masa se realizó en 450mL de cultivo de TB al que se le añadió 50mL de pre-inóculo.

Posteriormente se transfirió 50 mL de cultivo en tubos de 50 mL y se centrifugó a 15000g por 15 minutos y se descartó el sobrenadante; se repitió este paso cinco veces para obtener un único pellet para todo el cultivo inducido, el pellet final fue resuspendido en 50 mL de buffer de lisis al cual se le añadió 1.7 mL de lisosima (30mg/mL), a las células lisadas se les añadió 10mL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.1M (del inglés PMSFphenylmethylsulfonyl fluoride) que es un inhibidor de proteasas, se homogenizó evitando la formación de espuma. Se realizó la lisis por shock térmico 5 minutos a 37 °C y 15 minutos a -80 °C, para este paso se transfirió a tubos de 15mL, después de este paso se centrifugó a 15000g por 20 minutos para de ese modo eliminar los restos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 50mL. Se añadió 1mL de resina Ni-NTA 50% al sobrenadante y se incubó 2 horas con movimiento constante a 4°C. Debido al volumen de la purificación el sobrenadante con la resina se empaquetó en una columna y se lavó con 10mL de buffer de lavado (10mM de Imidazol) dos veces, se descartó el sobrenadante y se añadió 500µL de buffer de elusión (100mM de Imidazol) seis veces, guardando los eluidos a -20 °C hasta su uso.

3.7. Análisis de datos

El análisis *in silico* de los datos se realizó siguiendo las recomendaciones de cada software empleado anteriormente detallado. Para el análisis de la expresión de la proteína recombinante se tomó la cuantificación mediante el método de Bradford realizando la extrapolación de las absorbancias.

3.7.1. Cuantificación de la proteína recombinante RDTonB mediante Bradford

Para la cuantificación por el método de Bradford se realizó una curva de albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés BSA: bovine serum albumin) a partir de un kit de controles de 10 µg/mL, 7.5 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL Tabla 4 la cual nos da una ecuación de la recta de las absorbancias de ese modo se realizó la extrapolación con las absorbancias de los eluidos de la purificación en masa.

Tabla 4

Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Volumen	Reactivo	Volumen	Cantidad
Muestra	Bradford(µl)	Total (µl)	de
(µl)			BSA(µg)
10	190	200	1.25
10	190	200	2.5
10	190	200	5
10	190	200	7.5

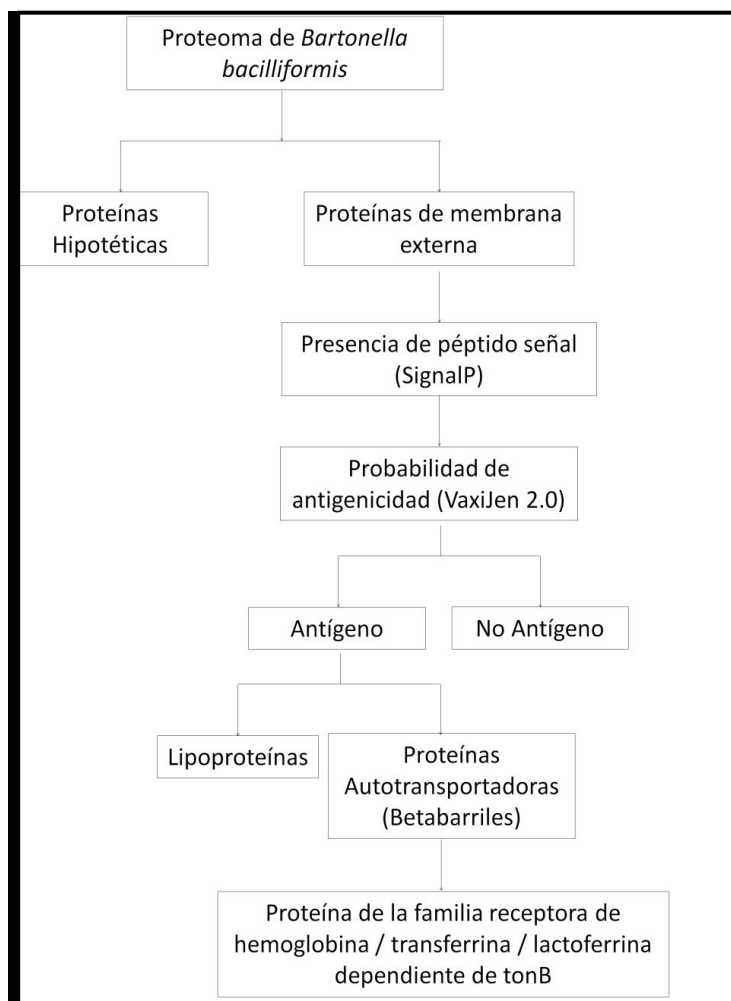
IV. RESULTADOS

4.1 Análisis Bioinformático

Del análisis sistemático de la base de datos de proteínas de membrana externa de *Bartonella bacilliformis* se obtuvo 384 proteínas que tenían péptido señal, de las cuales 217 son posibles antígenos analizados mediante el servidor VaxiJen, la mayoría eran autotransportadores con dominios beta barril y lipoproteínas. La selección de la proteína se hizo en base a su estructura conservada (beta barril) y su función la cual pertenece a la familia del receptor de hemoglobina dependiente de TonB como se muestra en el esquema figura 3.

Figura 3

Esquema de proceso de selección de proteína



La secuencia completa de aminoácidos de la proteína de la familia del receptor de la hemoglobina dependiente de TonB de *Bartonella bacilliformis*, se recuperó del GenBank [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_005766517.1?report=genbank&log\\$=protop&blast_rank=1&RID=SY2VRHAH014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_005766517.1?report=genbank&log$=protop&blast_rank=1&RID=SY2VRHAH014) en formato FASTA.

4.2 Modelado de homología

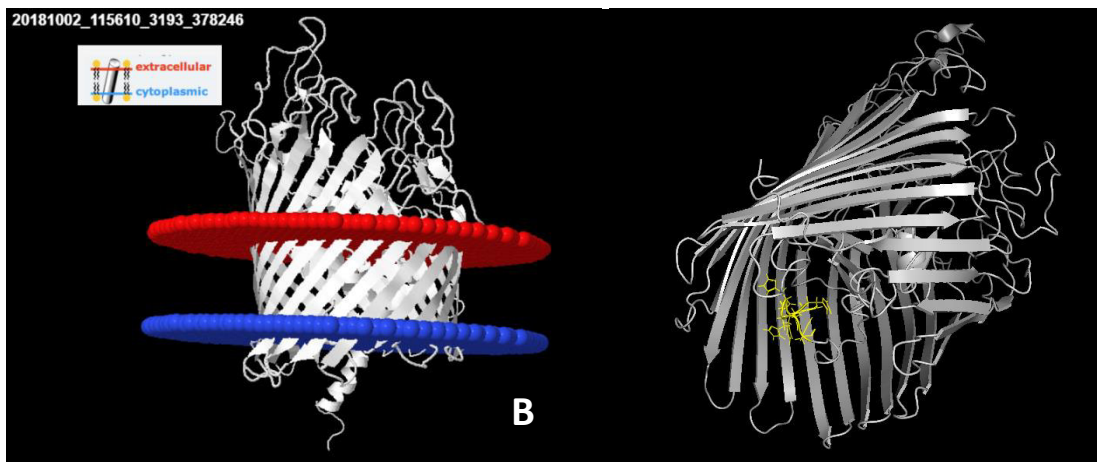
Para iniciar el proceso de modelado por homología se tuvo que buscar el mejor molde o plantilla de la proteína, ya que no se encuentra cristalizada ni forma parte de la base de datos de Protein Data Bank, es por ello que se usó el servidor Phyre2 el cual por su algoritmo nos muestra una serie de opciones que se han alineado con la secuencia de aminoácidos presentes en una proteína y que tienen diferentes porcentajes de identidad, de los cuales se eligió la que presentaba el mayor porcentaje que era el 21% de identidad perteneciente a la proteína de membrana externa receptor de hemo shua, que corresponde a la estructura cristalizada del transportador de hemo/hemoglobina shua a partir de *Shiguella dysenteriae*, dentro de las otras plantillas obtuvimos un 19% de identidad para una proteína cristalizada de membrana externa transportador de metal de unión a la transferrina a partir de *Neisseria meningitidis*, un 16% de identidad con una proteína cristalizada transportadora de metal dependiente de TonB a partir de *Pseudomonas fluorescens*. Del primer modelado por homología en Phyre2 después de obtener nuestra plantilla se hizo un análisis con Ramachandran donde la puntuación inicial de la suma de regiones favorables y permitidas fue de 99.4% como se aprecia en la Figura 4 y 82.9% de regiones más favorables. Luego se hizo un primer refinamiento de la estructura con la finalidad de mejorarla con el servidor Itasser con el análisis mediante ramachandran nos dió una puntuación del 98.2% Figura 5 con 87.4% de regiones más favorables, el segundo refinamiento de la estructura modelada se hizo en el servidor Galaxy refine donde la puntuación

para el análisis Ramachandran fue de 99.6% Figura 6 con 91.5% de regiones más favorables; para mejorar la estabilidad de nuestra estructura se hizo una minimización de energía con KOBAMIN Figura 7 donde se pudo apreciar que nuestro modelo se encuentra de dentro de los modelos de proteínas estudiadas por rayos X.

Para saber la orientación de la proteína en la membrana se hizo una predicción utilizando el servidor PPM server (<https://opm.phar.umich.edu/server>) Figura 8, viendo de ese modo elegir los epitopos expuestos como los más favorables por el fácil acceso que resultaría para poder ser detectados por el sistema inmunológico. Con la estructura modelada final se hizo una predicción de epitopes conformacionales por el servidor ElliPro.

Figura 8

Orientación: A) RDTonB de membrana externa de Bartonella bacilliformis empleando el servidor PPM Server, B) cola de histidinas modeladas en la proteína recombinante en color amarillo



4.3 Evaluación de la alergenicidad

Se empleó AlgPred para evaluación de alergenicidad en base a la similitud de un epítoto conocido de alguna región de la proteína, ya que integra varios enfoques para predecir proteínas alergénicas con gran precisión, de los seis enfoques el primero busca epítotos para inmunoglobulinas E en la proteína y en este caso nuestra proteína no presenta epítotos, el segundo enfoque busca asignar un alérgeno proteico si encontrase algún motivo, el tercer y cuarto enfoque busca predecir alérgenos basados en la composición de aminoácidos o dipéptidos, quinto enfoque realiza una búsqueda de BLAST contra 2890 péptidos representativos de alérgenos (ARP) y asigna un alérgeno proteico si es que hace match de BLAST y un último enfoque que es un análisis combinando (epítoto SVMc + IgE + ARPs BLAST + MAST). Se realizó todos los enfoques y en la mayoría nos mostró que no era alérgeno salvo en el análisis por composición de aminoácidos que fue el único que se obtuvo que era alérgeno, es por ello que se usó otro servidor para reforzar nuestro resultado, AllerTOP v.2 resultando de ese modo nuestra proteína probablemente no alérgica.

4.4 Evaluación de la antigenicidad

La evaluación de la antigenicidad determinó el curso de nuestro estudio, ya que el servidor VaxiJen predijo la probabilidad de que nuestra proteína sea un antígeno con un valor de 0.5837 que fue apoyado por el programa ANTIGENpro, en este caso predijo una probabilidad de antigenicidad de 0.855635. Con ayuda del SOLpro se obtuvo una probabilidad de 0.616332 que nuestra proteína sea soluble en una expresión en *E. coli* (Figura 9).

Figura 9

Resultados obtenidos por ANTIGENpro con la probabilidad de solubilidad y antigenicidad de nuestra proteína.

```
Predicted Solubility upon Overexpression:  
SOLUBLE with probability 0.616332
```

```
Predicted Probability of Antigenicity:  
0.855635
```

4.5 Evaluación de los parámetros físico-químicos

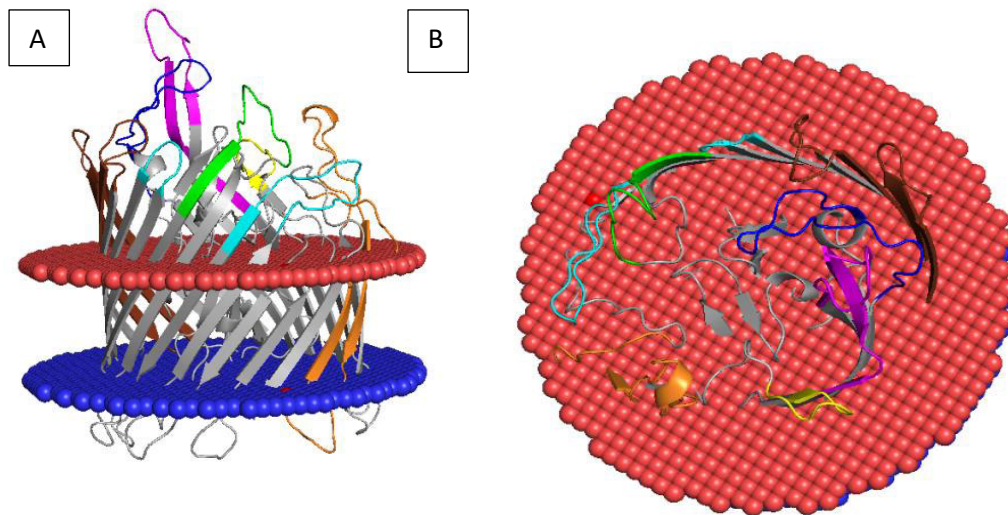
ProtParam nos muestra que la proteína cuenta con 73 aminoácidos cuyo peso molecular teórico es 82.72 kDa, punto isoelectrico 7.36, tiene 77 residuos de carga positiva (Asp+Glu), 77 residuos de carga negativa (Arg+Lys), tiempo estimado de vida 30 horas en reticulocitos de mamíferos *in vitro*, mayor de 20 horas en lavadura *in vitro*, mayor de 10 horas en *Escherichia coli in vivo*, índice de estabilidad de 30.8 lo que la describe como una proteína estable. Dentro de su composición cuenta con 19 aminoácidos diferentes de los cuales 10 son aminoácidos esenciales y 9 son aminoácidos no esenciales, los aminoácidos que se encuentran en mayor número son la asparagina, ácido aspártico, glicina, leucina y serina, los aminoácidos que se encuentran en menor número son cisteína y metionina.

4.6 Predicción de epítomos de unión a CMH-I, CMH-II, CTL, células B

Del análisis bioinformático se encontró epítomos lineales de gran afinidad de unión a CMH-I, CMH-II, CTL, en células B y que además tengan una ubicación espacial extracelular tal como se muestran en las Tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11 (ver anexos), a su vez también se tiene epítomos conformacionales de los cuales tenemos regiones extracelulares como se indica en la Tabla 12 y visualizada en el Figura 10.

Figura 10

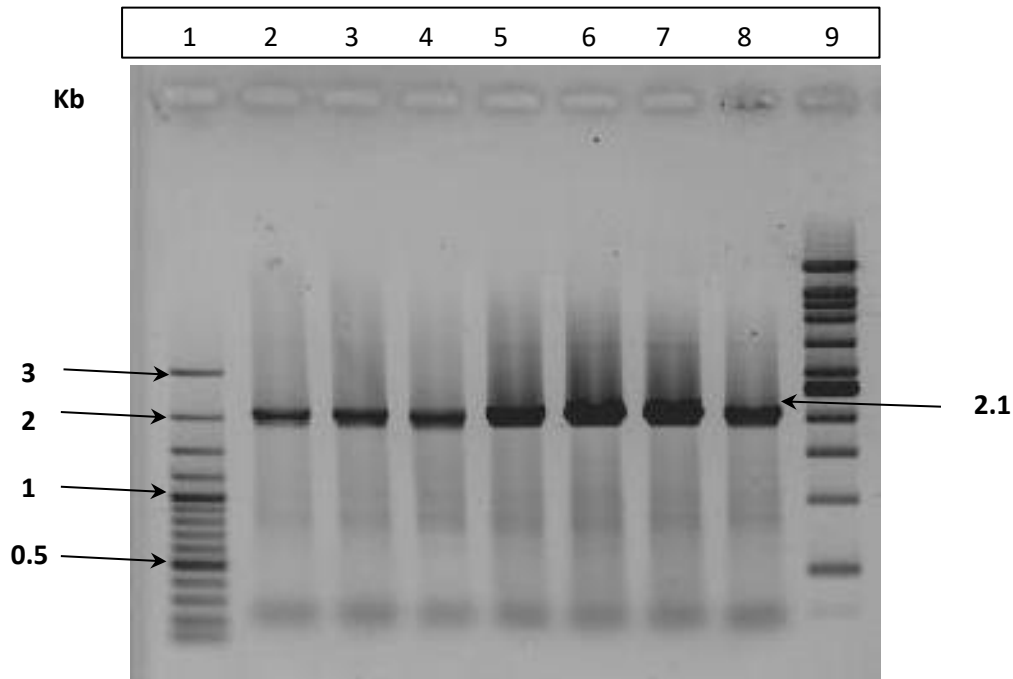
Epítopes conformacionales de la proteína RDTonB analizados por el servidor ElliPro con ubicación espacial extracelular. A) Vista lateral, B) Vista frontal extracelular.

**4.7 Amplificación del gen RDTonB**

Se realizó una PCR para el gen RDTonB donde se evaluó la temperatura de hibridación óptima de los primers, teniendo en cuenta su temperatura de melting (Nierman et al.), así como la información que aparece en la hoja técnica de síntesis de cada primer. Después de analizar los productos de PCR se eligió 58°C por la intensidad de la banda, véase en la figura 11.

Figura 11

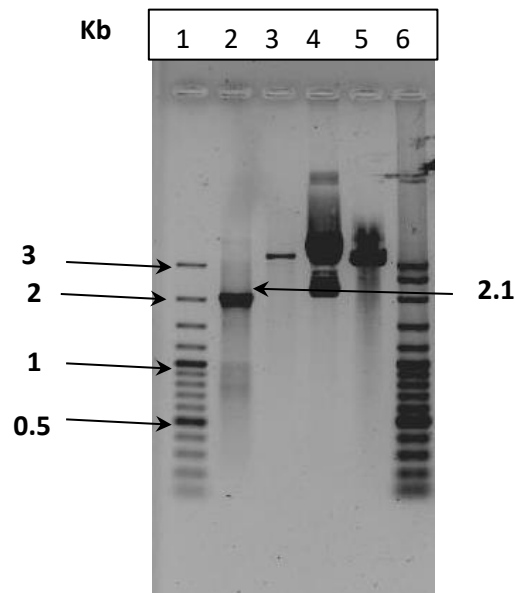
PCR gradiente de temperaturas de pQE31+rTonB; 1) Ladder 100pb, 2) 51°C, 3) 52°C, 4) 54,1°C, 5) 56°C, 6) 57,9°C, 7) 60°C, 8) 62°C, 9) 58,9°C, 10) Ladder 100pb. Gel de agarosa 1%.

**4.8 Ligación de pQE31 con el gen rRDTonB**

Los productos de PCR para el gen rRDTonB fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y Sall al igual que el vector pQE31 y para verificar su correcta digestión se corrió un gel de agarosa 1% como muestra la figura 12 y cuya concentración del gen rRDTonB fue 52,96 ng/ μ L y pQE31 11,24 ng/ μ L.

Figura 12.

Digestión del plásmido y el inserto con BamHI y Sall: 1) ladder 100pb plus, 2) gen RTonB digerido con BamHI/Sall, 3) pQ31 digerido con BamHI/Sall, 4) pQE31 sin digerir, 5) pQE31 digerido con BamHI y 6) ladder 100pb. Gel de agarosa 1%.

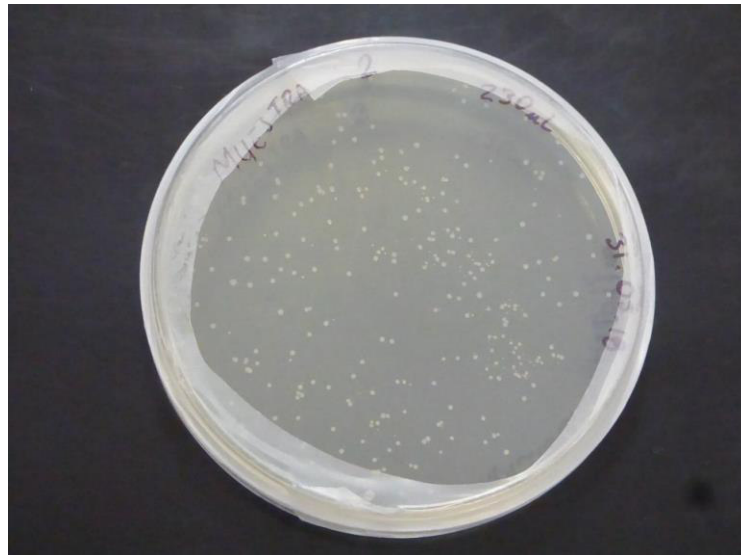
**4.9 Transformación de *Escherichia coli* Top 10 con el ligando pQE31/gen RDTonB**

Para la transformación en células competentes de *E. coli* TOP10 se añadió 5 μ L de nuestro ligando (pQE31+RDTonB) y se observó el crecimiento de colonias pequeñas tras 24 horas de incubación de las placas agar LB con ampicilina, véase en la figura 13.

Se hizo una PCR colonia para verificar la presencia del inserto en la bacteria, seguidamente se realizó un repique de colonias en caldo LB complementado con ampicilina toda la noche a 37°C para luego proceder a la extracción del plásmido por lisis alcalina.

Figura 13

Crecimiento de colonias de E. coli Top 10 que contienen nuestro gen RDTonB con plásmido pQE31

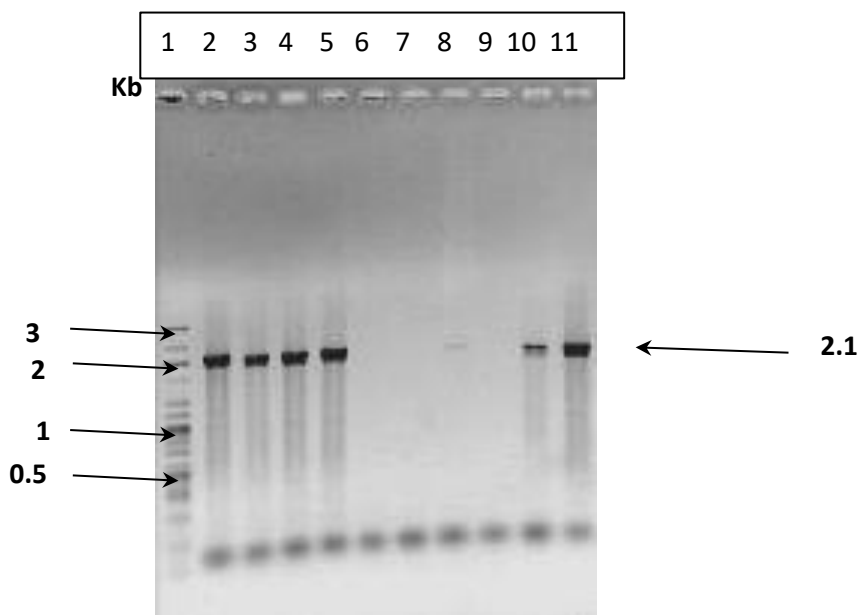


4.10 Transformación del ligando pQE31/gen **RDTonB en *Escherichia coli* BL21 PLysS DE3**

Para la transformación en células competentes de *E. coli* BL21 plyss se añadió 5 μ L de nuestro DNA ligado (pQE31-RDTonB) y se observó el crecimiento de colonias pequeñas tras 24 horas de incubación de las placas agar LB con ampicilina. Para verificar si las colonias que han crecido en la placa contienen nuestro gen de interés se hizo una PCR y se observó que 7 de las 10 colonias analizadas mostraron presencia del gen de interés como se observa en la figura 14.

Figura 14

PCR de colonias C9 transformadas en *E. coli* BL21 pLysS crecidas en placas de agar LB con ampicilina: 1) ladder 100pb plus, 2-5,8,10-11) colonias transformadas que contienen el gen RDTonB, 6-7,9) colonias sin amplificación del gen RDTonB

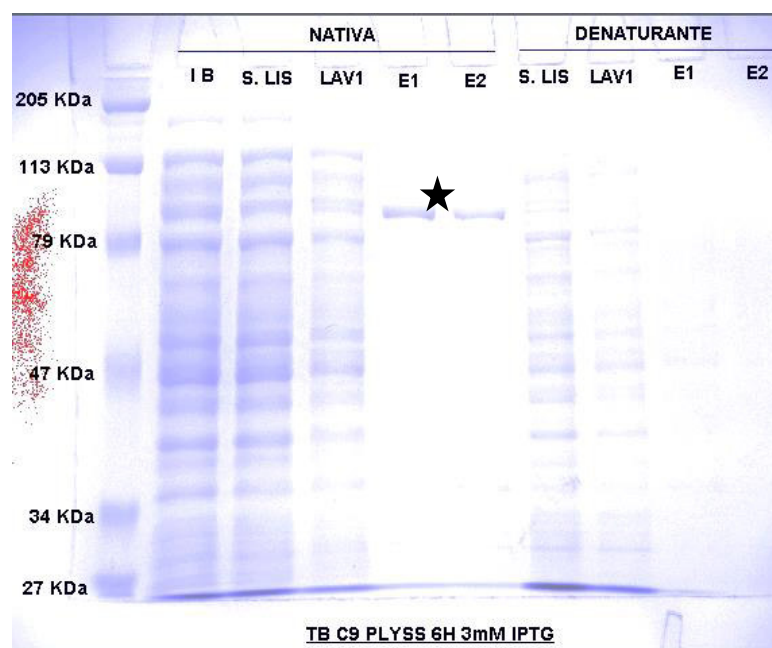


4.11 Producción de la proteína recombinante en *Escherichia coli* BL 21 PLysS DE3

La inducción de la proteína recombinante se dio bajo las condiciones de crecimiento en caldo LB, OD1, 37°C, 3mM IPTG, 220 rpm, 6 horas de inducción, cuya purificación se hizo en condiciones nativas las que evidenciaron producción de la proteína recombinante de 80 KDa ver figura 15; para verificar si la proteína recombinante tenía comportamiento insoluble se realizó una purificación en condiciones denaturantes con el pellet de la purificación en condiciones nativas y con ello se verificó que no hay proteína recombinante insoluble, estos corroboró la predicción hecha por el servidor ANTIGENpro sobre la naturaleza soluble en la expresión en *E. coli*.

Figura 15

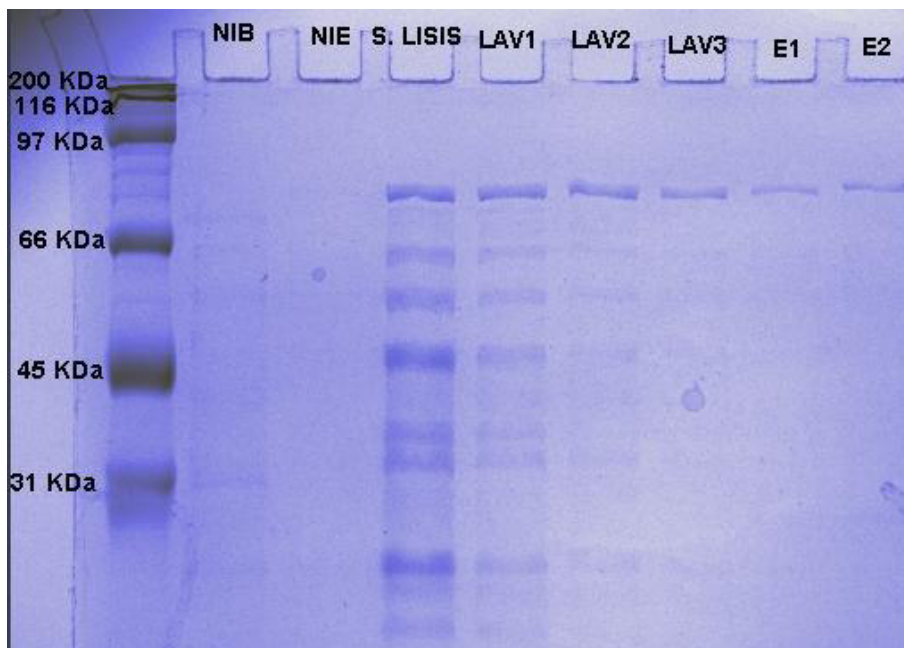
Purificación de la proteína RDTonB 80 KDa (★) en un gel de poliacrilamida 10%; IB: lisado de inducción en bruto o total, S. LIS: sobrenadante del lisado con resina NiNTA, LAV1: primer lavado realizado con buffer a 20 mM de imidazol, E1: primer eluido, E2: segundo eluido. Izquierda condición de purificación Nativa y derecha condición de purificación insoluble o denaturante.



Una vez que se evidenció la producción de la proteína recombinante se decidió inducirla en condiciones nativas tales como condiciones de crecimiento en caldo LB, OD1, 37°C, 1mM IPTG, 220 rpm, 4 horas de inducción obteniendo resultados favorables como la muestra la figura 16.

Figura 16

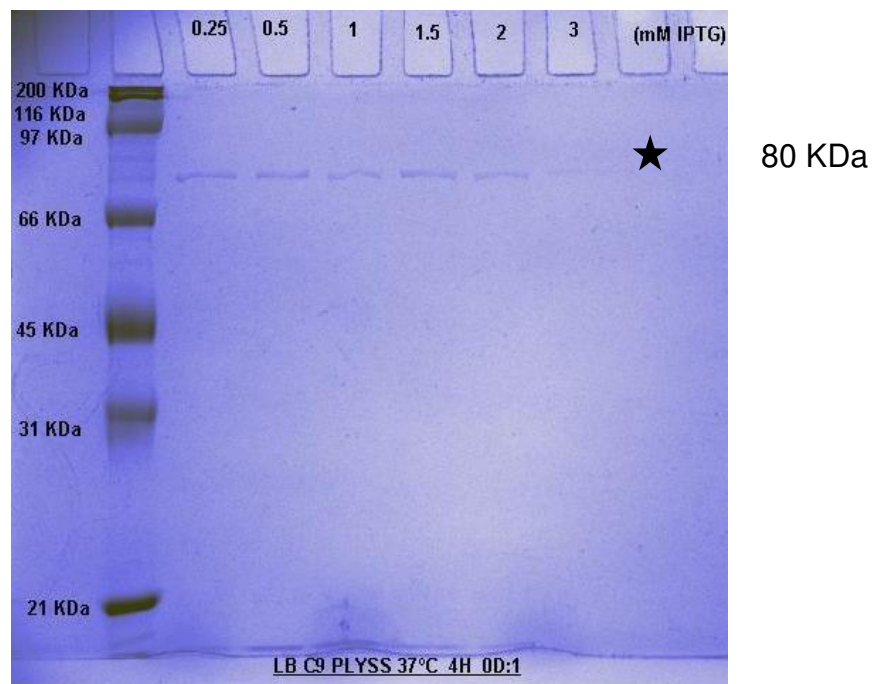
Purificación de la proteína RTonB 80 KDa (★) en un gel de poliacrilamida 10%; NI: no inducción, NIE: eluído del no inducido, S.LIS: sobrenadante de lisis, LAV1: primer lavado realizado con buffer a 20 mM de imidazol, LAV2: segundo lavado, LAV3: tercer lavado, E1: primer eluído, E2: segundo eluído, E3: tercer eluído. Se observa una pérdida de proteína en los lavados con 20 mM IMIDAZOL.



Para mejorar el rendimiento de la producción de la proteína recombinante y sus costos se hizo una estandarización de diferentes concentraciones de IPTG iniciando por una concentración de 0.25 mM , 0.5 mM, 1 mM, 1.5mM, 2mM ,3mM ; y cuyas condiciones de crecimiento fueron caldo LB, OD1, 37°C, 1mM IPTG, 220 rpm, 4 horas de inducción. Cuando se observó el gel de poliacrilamida para ver los productos bajo esta condiciones se observó que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de IPTG es por ello que se decidió elegir la de menor concentración 0.25 mM IPTG como se observa en la figura 17.

Figura 17

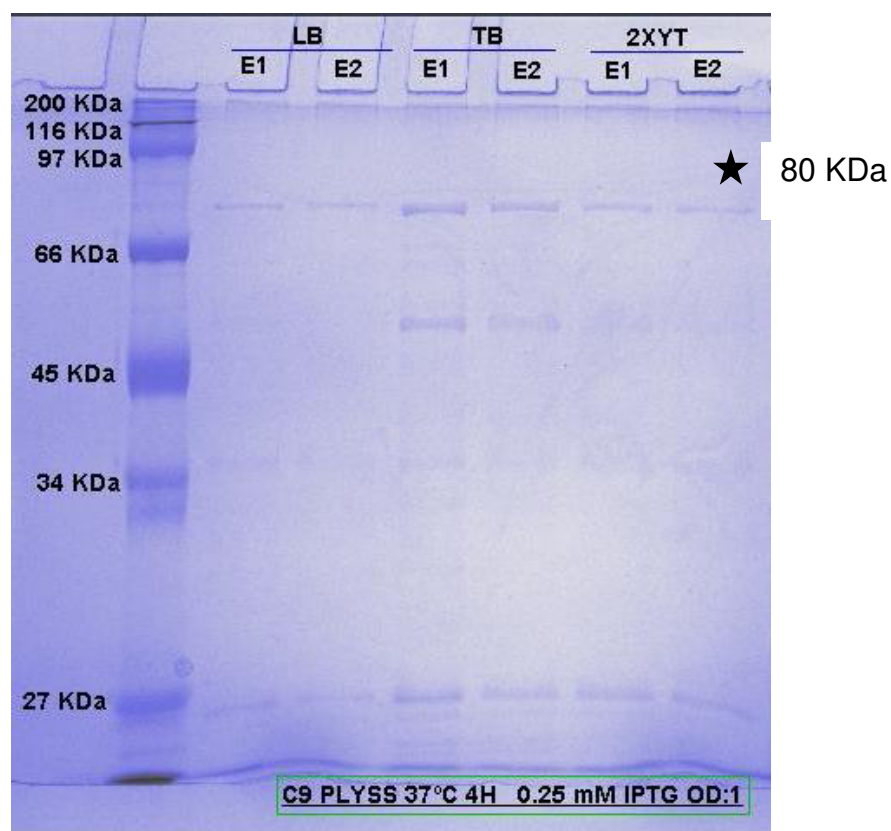
Purificación de la proteína rRTonB 80 KDa () en un gel de poliacrilamida 10% ; siguiendo el protocolo de purificación donde solo se corrió los primeros eluidos de las diferentes concentraciones de IPTG las cuales fueron 0.25 mM IPTG, 0.5 mM IPTG, 1 mM IPTG, 2 mM IPTG y 3 mM IPTG.



Otra de las condiciones que se buscó mejorar fue el medio en el que estaba creciendo nuestro cultivo, es por ello que se decidió probar dos medios adicionales al que ya se estaba usando como lo Terrific Broth (TB) y 2XYT bajo un OD1, 37°C, 0.25 mM IPTG, 220 rpm, 4 horas de inducción. El gel de poliacrilamida evidenció que el medio TB era el más adecuado para el cultivo ya que nos da una mayor producción de la proteína recombinante como lo muestra la figura 18.

Figura 18

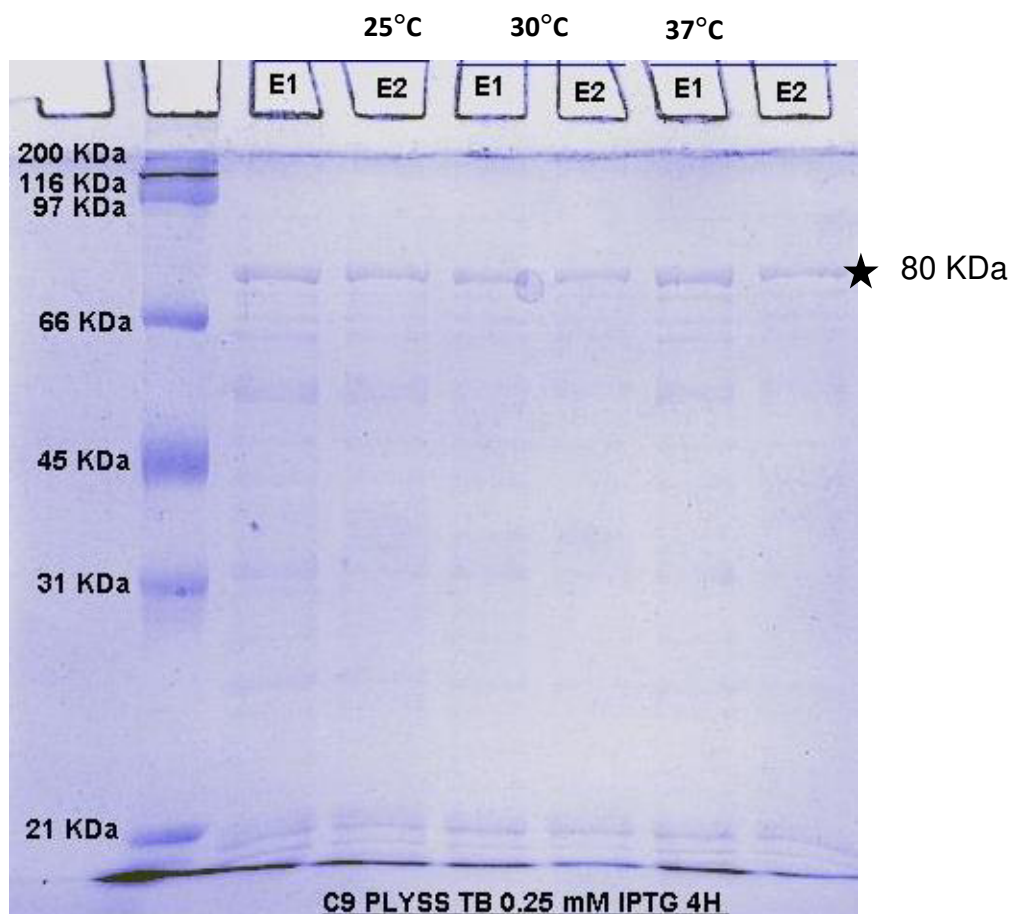
Purificación de la proteína rRTonB 80 KDa () en un gel de poliacrilamida 10%; siguiendo el protocolo de purificación donde se corrió los dos primeros eluidos de los diferentes medios de cultivos analizados: LB, TB, 2XYT. Se realizó dos lavados con buffer 10 mM de imidazol para evitar la pérdida de proteína recombinante que se observaba en los lavados con 20 mM de imidazol.



Otra variable evaluada fue la temperatura de expresión de la proteína, utilizando tres temperaturas diferentes 25 °C, 30 °C y 37 °C, con un OD1.5, TB, 0.25mM IPTG, 220 rpm, 4 horas de inducción, donde la temperatura óptima fue 25°C como se observa en la figura 19.

Figura 19

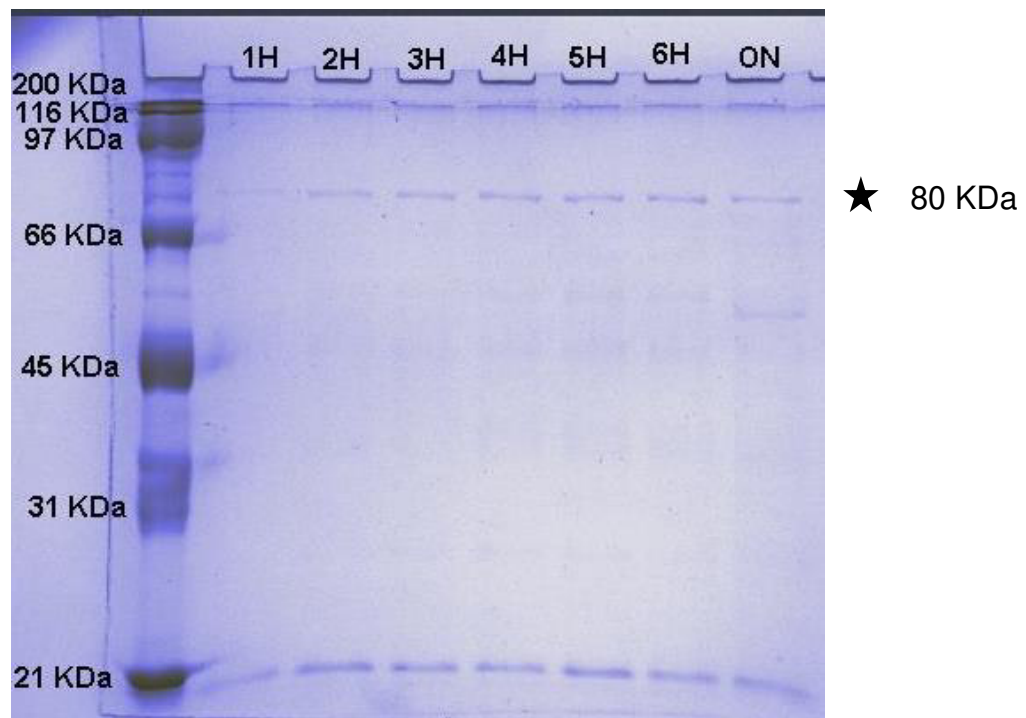
Purificación de la proteína rRDTonB 80 KDa () en un gel de poliacrilamida 10% ; siguiendo el protocolo de purificación donde se corrió los dos primeros eluidos de los cultivos a diferentes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 37 °C. Se realizó tres lavados con buffer 10 mM de imidazol para evitar la pérdida de proteína recombinante y para eliminar las proteínas inespecíficas presentes. E1: primer eluido, E2: segundo eluido.



Otra de las estandarizaciones fueron los tiempos de inducción llegando a probar 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas y toda la noche con un OD 0.8, 25 °C , 220 rpm, TB, 0.25 mM IPTG cuyos resultados se observan en la figura 20 donde se eligió trabajar con 5 horas de inducción.

Figura 20

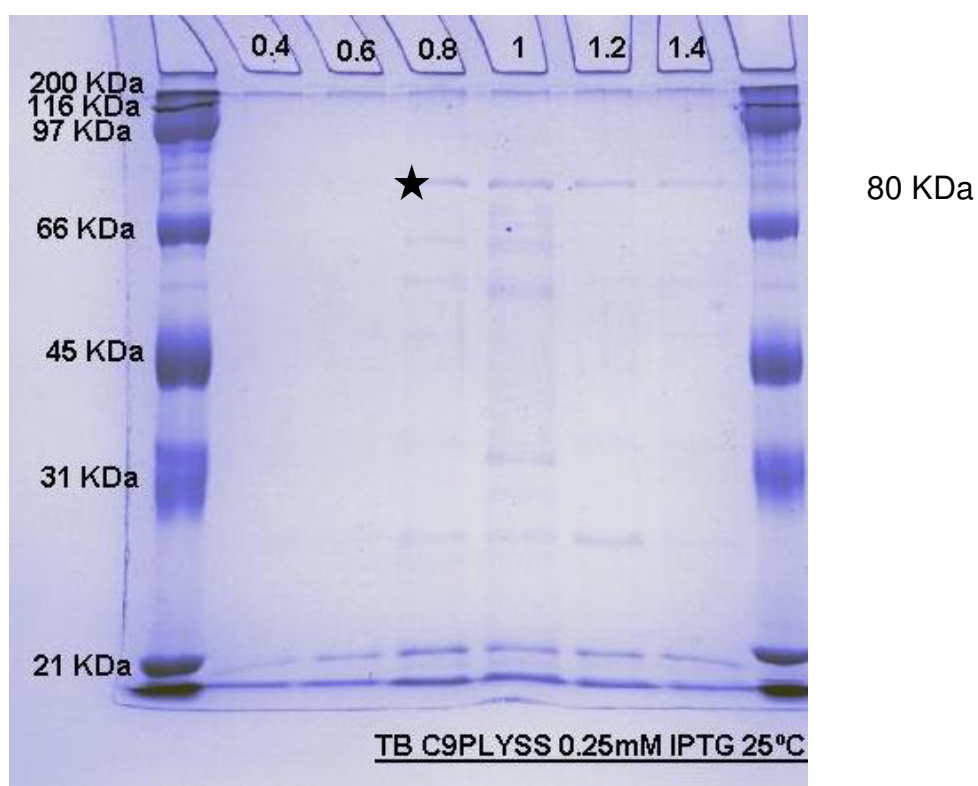
Purificación de la proteína rRTonB 80 KDa () en un gel de poliacrilamida 10% ; siguiendo el protocolo de purificación donde se corrió el primer eluido de los cultivos a diferentes tiempos de inducción: 1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H y overnight. Se realizó dos lavados con buffer 20 mM de imidazol y un lavado con 10mM de imidazol.



Otro factor importante en la producción de la proteína recombinante es la densidad óptica del crecimiento bacteriano del cultivo al momento de iniciar la inducción, es por ello que se probaron seis tipos diferentes de OD los cuales fueron de 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 y 1.4 con 25 °C, TB, 0.25 mMIPTG, 220 rpm, 5 horas de inducción. Cuando analizamos los resultados las densidades óptimas favorables para nuestro cultivo fueron los OD 0.8, OD 1, OD 1.4 optando por elegir el OD 0.8 como lo muestra la figura 21.

Figura 21

Purificación de la proteína rRTonB 80 KDa en un gel de poliacrilamida 10% ; siguiendo el protocolo de purificación donde se corrió el primer eluído de los cultivos a diferentes OD antes de proceder con la inducción: OD 0.4, OD 0.6, OD 0.8, OD 1, OD 1.2 y OD 1.4. Se realizó 2 lavados con 10 mM imidazol.



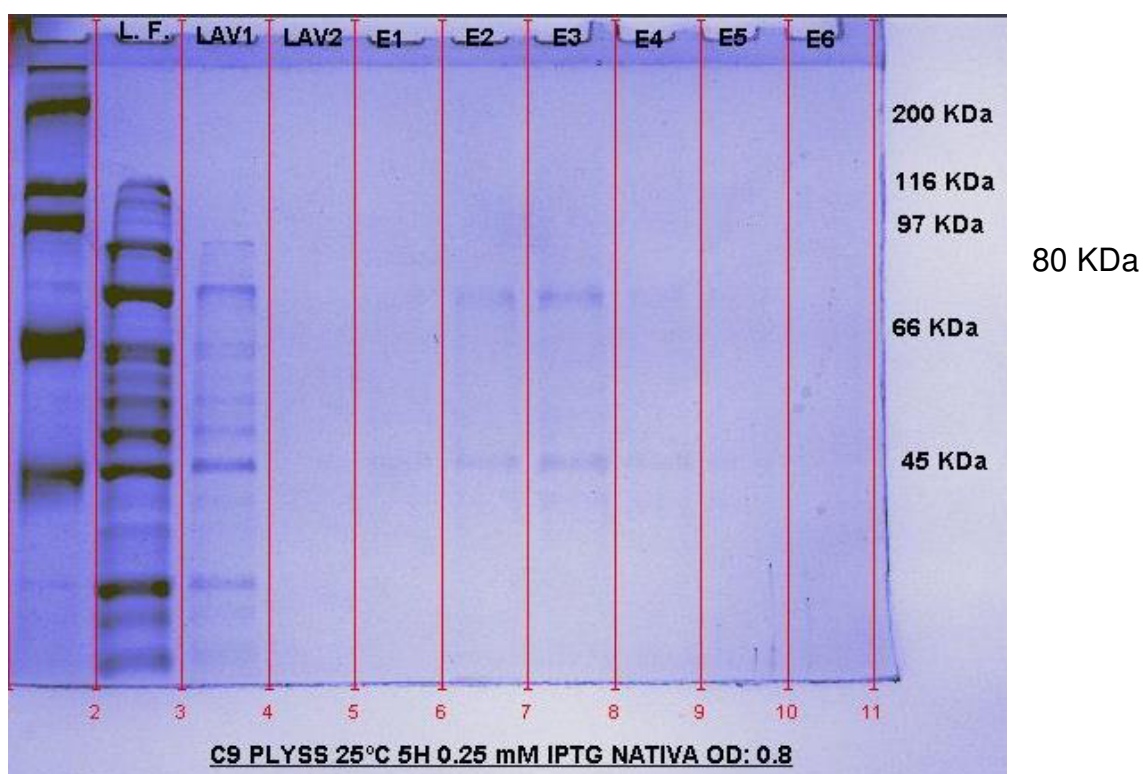
Una vez finalizada las estandarizaciones, el resultado de las condiciones más apropiadas para la producción de la proteína fueron las siguientes: medio TB, inducción a 25 °C, OD 0.8, 0.25 mM IPTG, 220 rpm y 5 horas de inducción. Con una purificación en condiciones nativas o solubles.

4.12 Expresión en masa del gen rTonB/pQE31 en E. coli BL21 PLysS DE3

Como resultado de la expresión en masa de purifico y como resultado se obtuvo dos eluidos de nuestra proteína recombinante tal como se observa en la figura 26 para luego ser cuantificada por Bradford obteniendo una concentración de $0,06 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ tal como se observa en la figura 22.

Figura 22

Purificación de la proteína rTonB 80 KDa () en un gel de poliacrilamida 10%; L.F.: primer filtrado por el paso de la columna de NiNTA, LAV1: primer lavado realizado con buffer a 20 mM de imidazol, LAV2: segundo lavado, E1: primer eluido, E2: segundo eluido, E3: tercer eluido, E4: cuarto eluido, E5: [★] quinto eluido y E6: sexto eluido.



V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enfermedad de Carrión causada por *Bartonella bacilliformis* tiene pocos estudios enfocados a vacunas con proteínas recombinantes, sin embargo estudios similares en bacterias gram negativas como *Bartonella bacilliformis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* enterotoxigénica usaron herramientas bioinformáticas identificando regiones antigénicas o epitopes de células T, células B en proteínas de membrana externa y su unión al complejo mayor de histocompatibilidad, así como propiedades no alergénicas o tóxicas para el hombre mostrando hallazgos importantes al nuestro para el desarrollo de una vacuna (Dhanda et al., 2016; Mehla & Ramana, 2016; Padilla Rojas et al., 2019; Tanu et al., 2014), cabe recalcar que para este estudio se analizaron alelos supertipo y alelos peruanos del complejo mayor de histocompatibilidad teniendo epitopes de gran afinidad de unión.

La expresión del gen RD_{tonB} de *Bartonella bacilliformis* fue viable, pero durante la optimización se observó que el incremento de la concentración del IPTG sobre la producción soluble de rRD_{tonB} desde 0.25 mM se mantuvo hasta 1.5mM, sin embargo cuando el IPTG fue mayor a 1.5 mM fue disminuyendo la producción de rRD_{tonB} (Figura 21) esto podría atribuirse a la falta de plegamiento, al transporte de rRD_{tonB} o a un aumento de cuerpos de inclusión desnaturalizados bajo una fuerza de inducción mayor, por lo tanto para adquirir un nivel más alto de proteínas recombinantes solubles la concentración 0.25mM de IPTG en este estudio tuvo un efecto positivo. Se ha reportado que una inducción baja en temperatura y concentraciones de IPTG, medios más enriquecidos como TB dan lugar a una mejor expresión de proteína recombinante en *E coli* BL21 DE3 (Choi & Geletu, 2018) en este estudio se obtuvo mejores resultados de expresión a 0.25mM de IPTG, caldo TB, 25°C .

Estudios en proteínas recombinantes reportan la inducción con lactosa en lugar de IPTG, donde la lactosa es un mejor inductor y podría ser utilizado como fuente de carbono incluso en presencia de glucosa, mejorando de ese modo la producción (Xu et al., 2006). Otra de las opciones para mejorar producción del RDTonB en un futuro podría ser mediante el efecto del estrés oxidativo tal como lo hicieron para la expresión recombinante de catalasa mediante la adición de 2% de etanol el cual mostró una mayor optimización de la fermentación de *E. coli* BL21 (pET26b-Kata) (Yu et al., 2016). Chhetri y colaboradores publican un protocolo de tratamiento de estrés oxidativo como una estrategia usada para la sobreproducción de proteínas recombinantes utilizando etanol en *Eschechia coli* partiendo de la premisa de que el IPTG muestra una baja expresión de niveles en algunas proteína recombinantes, cuya validación del método fue hecho con varias proteínas recombinantes, dando mejores resultados a 3% de etanol (v/v) y funciona tanto para promotores bacterianos T5 (pQE) y T7 (Chhetri et al., 2015; P. Wang et al., 2016) y podría ser usado para la mejor expresión del RDTonB ya que el vector de expresión usado en este estudio fue pQE31 el cual cuenta con el promotor T5. El tratamiento por estrés oxidativo para una sobreproducción de proteínas recombinantes con dominio extracelular de *Bartonella bacilliformis* que han tenido baja expresión con IPTG fue usada con resultados satisfactorios (Flores, 2019).

Otra de las posibles causas de la baja producción de rRDTonB puede deberse a que la sobreexpresión de proteínas de membrana son un desafío, ya que se han considerado muy tóxicas y difíciles de expresar; las proteínas de membrana se enriquecen principalmente en pequeñas cantidades; sin embargo, se pueden estar agregando debido a sus regiones hidrófobas expuestas en la superficie (Fahnert et al., 2004).

VI. CONCLUSIONES

- 6.1. Del análisis bioinformático se evidenció que RDTonB presenta epitopes para células B y células T, que esta proteína es antigénica, no es alérgica, presentando una conformación estructural con dominios característicos de esta familia beta barril con estructura inmersa dentro de la membrana. Presentando características ideales para ser considerada como una buena candidata a vacuna.
- 6.2. Se clonó y expresó satisfactoriamente la proteína recombinante RDTonB en *E. coli* en condiciones de laboratorio.
- 6.3. Se optimizó la producción de la proteína recombinante del RDTonB (rRDTonB) de *Bartonella bacilliformis*.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1. Optar por aplicar otro método de optimización de la producción de la proteína recombinante RDTonB empleando la metodología de estrés oxidativo con etanol al 3%.

VIII. REFERENCIAS

- Abdollahi, S., Rasooli, I., & Mousavi Gargari, S. L. (2018). An in silico structural and physicochemical characterization of TonB-dependent copper receptor in *A. baumannii*. *Microb Pathog*, *118*, 18-31. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.009>
- Angkasekwinai, N., Atkins, E. H., Romero, S., Grieco, J., Chao, C. C., & Ching, W. M. (2014). An evaluation study of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant protein Pap31 for detection of antibody against *Bartonella bacilliformis* infection among the Peruvian population. *Am J Trop Med Hyg*, *90*(4), 690-696. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0131>
- Bhasin, M., & Raghava, G. (2004). Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques. *Vaccine*, *22*(23), 3195-3204.
- Ciro, M. V., César, U.-G., Breña Chávez, P., Eloy, O. E., Ventosilla López, P., Erick, H. C., & César, H. C. (2008). Actualización de la enfermedad de Carrión. *Rev Med Hered*, *19*(1), 37.
- Chhetri, G., Kalita, P., & Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, *2*, 385-391. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>
- Choi, T. J., & Geletu, T. T. (2018). High level expression and purification of recombinant flounder growth hormone in *E. coli*. *J Genet Eng Biotechnol*, *16*(2), 347-355. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.006>
- Chopra, G., Kalisman, N., & Levitt, M. (2010). Consistent refinement of submitted models at CASP using a knowledge-based potential. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *78*(12), 2668-2678.

- Dhanda, S. K., Usmani, S. S., Agrawal, P., Nagpal, G., Gautam, A., & Raghava, G. P. (2016). Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. *Briefings in bioinformatics*, *18*(3), 467-478.
- Dimitrov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2013). AllerTOP-a server for in silico prediction of allergens. *BMC bioinformatics*, *14*(6), S4.
- Doolan, D. L., Apte, S. H., & Proietti, C. (2014). Genome-based vaccine design: the promise for malaria and other infectious diseases. *Int J Parasitol*, *44*(12), 901-913. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.07.010>
- Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics*, *8*(1), 4.
- Fahnert, B., Lilie, H., & Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, *89*, 93-142.
- Flores Nuñez, A. C. (2019). *Clonamiento y expresión en sistema procariótico del dominio extracelular de la proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos – D (LptD) de Bartonella bacilliformis*. [Tesis para optar el título profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología.
- Frumdieck, C. F. (1949). La Enfermedad de Carrión o Verruga en el Niño. *Anales de la Facultad de Medicina*, *4*(XXXII), 227-306.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*: Springer.
- Gomes, C. & Ruiz, J. (2018). Carrion's Disease: the Sound of Silence. *Clin Microbiol Rev*, *31*(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-17>
- Goycochea Valdivia, W. A. (2018). Vacunología inversa: Abriendo paso al futuro para el

- desarrollo de nuevas vacunas. *Canarias Pediátrica*; 42(2), 100–105.
<https://sctfe.com/wp-content/uploads/2020/10/42-2-Vacunologia-inversa.pdf>
- Gray, G. C., Johnson, A. A., Thornton, S. A., Smith, W. A., Knobloch, J., Kelley, P. W., . . . Wignall, F. S. (1990). An epidemic of Oroya fever in the Peruvian Andes. *Am J Trop Med Hyg*, 42(3), 215-221. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.215>
- Hickman, S. J., Cooper, R. E. M., Bellucci, L., Paci, E. & Brockwell, D. J. (2017). Gating of TonB-dependent transporters by substrate-specific forced remodelling. *Nat Commun*, 8, 14804. <https://doi.org/10.1038/ncomms14804>
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14(1), 33-38, 27-38.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.
- Krueger, C. M., Marks, K. L. & Ihler, G. M. (1995). Physical map of the *Bartonella bacilliformis* genome. *Journal of bacteriology*, 177(24), 7271-7274.
- Krumdieck, C. F. (1949). Enfermedad de Carrión o Verruga en el niño. *Anales de La Facultad de Medicina*, XXXII(4), 227–306.
- López Guimaraes, D., Giraldo Villafane, M. & Maguiña Vargas, C. (2006). Gyneco-obstetric complications in acute bartonellosis: 50 cases observed in Caraz, Ancash. *Acta Médica Peruana*, 23, 148-151.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., . . . Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 50(3), 437-450.

- Magnan, C. N. & Baldi, P. (2014). SSpro/ACCpro 5: almost perfect prediction of protein secondary structure and relative solvent accessibility using profiles, machine learning and structural similarity. *Bioinformatics*, 30(18), 2592-2597.
- Maguiña, C., Guerra, H. & Ventosilla, P. (2009). Bartonellosis. *Clin Dermatol*, 27(3), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.10.006>
- Maguiña Vargas, C. (2003). Bartonellosis o enfermedad de Carrión: nuevos aspectos de una vieja enfermedad. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(1), 22-22.
- Maguiña Vargas, C., Acosta, R., Gotuzzo, E., Cabrera, J., Campos, P., Echevarría, J., . . . Ferrufino, J. C. (1996). Compromiso del sistema nervioso central en la enfermedad de Carrión. *Rev. neuropsiquiatr*, 59(1/2), 3-25.
- Mehla, K. & Ramana, J. (2016). Identification of epitope-based peptide vaccine candidates against enterotoxigenic *Escherichia coli*: a comparative genomics and immunoinformatics approach. *Molecular BioSystems*, 12(3), 890-901.
- Meneghini, L. M., Tripathi, S., Woodworth, M. A., Majumdar, S., Poulos, T. L. & Weiss, G. A. (2017). Dissecting binding of a beta-barrel membrane protein by phage display. *Mol Biosyst*, 13(8), 1438-1447. <https://doi.org/10.1039/C7MB00163K>
- MINSA (2019). Situación epidemiológica de la enfermedad de Carrión en el Perú. *Boletín Epidemiológico del Perú*, 28.
- Mishra, S. & Manish, M. (2018). Studies on computational grafting of malarial epitopes in serum albumin. *Comput Biol Med*, 102, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2018.09.018>
- Nielsen, M. & Andreatta, M. (2016). NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Medicine*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0288-x>

- Pachas Chavez, E. P. (2001). Enfermedad de Carrión (bartonelosis) en el Perú. *Lima, Peru: Ministerio de Salud.*
- Pachas, P. (2000). Epidemiología de la Bartonelosis en el Perú. *Lima, Peru: Ministerio de Salud.*
- Padilla Rojas, C., Lope Pari, P., Santos Solis, L., Osorio Mogollón, C., Inga Angulo, L., Bailon Calderon, H., Ventura Egusquiza, G. (2019). Diseño y evaluación de una proteína multiepitópica como candidata para vacuna contra la enfermedad de Carrión. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 36(3), 414-422.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4430>
- Patrucco, R. (1983). Estudio de los parámetros inmunológicos en pacientes portadores de la enfermedad de Carrión. *Diagnóstico*, 12(4), 138-144.
- Saha, S., & Raghava, G. (2006). AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W202-W209.
- Sanchez Clemente, N., Ugarte-Gil, C., Solorzano, N., Maguina, C., & Moore, D. (2016). An Outbreak of *Bartonella bacilliformis* in an Endemic Andean Community. *PLoS One*, 11(3), e0150525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150525>
- Schultz, M. G. (1968). A history of bartonellosis (Carrion's disease). *Am J Trop Med Hyg*, 17(4), 503-515. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1968.17.503>
- Sun, P., Guo, S., Sun, J., Tan, L., Lu, C., & Ma, Z. (2019). Advances in In-silico B-cell Epitope Prediction. *Curr Top Med Chem*, 19(2), 105-115.
<https://dx.doi.org/10.2174/1568026619666181130111827>
- Tanu, A. R., Ashraf, M. A., Hossain, M. F., Ismail, M., & Shekhar, H. U. (2014). Identification and validation of T-cell epitopes in outer membrane protein (OMP) of *Salmonella typhi*. *Bioinformatics*, 10(8), 480.

- Tarazona, A., Maguiña, C., López de Guimaraes, D., Montoya, M., & Pachas, P. (2006). Terapia antibiótica para el manejo de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión en el Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 23(3), 188-200.
- Taye, A., Chen, H., Duncan, K., Zhang, Z., Hendrix, L., Gonzalez, J., & Ching, W. (2005). Production of recombinant protein Pap31 and its application for the diagnosis of Bartonella bacilliformis infection. *Ann N Y Acad Sci*, 1063, 280-285. <https://doi.org/10.1196/annals.1355.045>
- Ventura, G., & Padilla, C. (2006, Setiembre). *Diagnóstico bacteriológico de la bartonelosis humana o enfermedad de Carrión*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud
- Vita, R., Mahanda, S., Overton, J., Martini, S., Wheeler, D., Sette, A., & Peter, B. (2019). The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30357391/>
- Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothe, B., Sette, A., & Peters, B. (2008). A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS computational biology*, 4(4), e1000048.
- Wang, R., Xu, H., Du, L., Chou, S. H., Liu, H., Liu, Y., . . . Qian, G. (2016). A TonB-dependent receptor regulates antifungal HSAF biosynthesis in *Lysobacter*. *Sci Rep*, 6, 26881. <https://doi.org/10.1038/srep26881>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W407-W410.
- Xu, J., Zhu, Z., Duan, P., Li, W., Zhang, Y., Wu, J., . . . Liu, J. (2006). Cloning, expression, and purification of a highly immunogenic recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) chimeric peptide. *Protein Expr Purif*, 50(2), 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.08.016>

- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, *12*(1), 7-8.
- Yon Fabián, C. (2021). Situación epidemiológica de enfermedad de Carrión en el Perú 2020-2021. *Boletín Epidemiológico Del Perú*, *30*, 291–294.
- Yu, Z., Zheng, H., Zhao, X., Li, S., Xu, J., & Song, H. (2016). High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching. *Bioresour Technol*, *214*, 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.110>

IX. ANEXOS

Tabla 6

Epítopes de alta afinidad al MHC-I para alelos peruanos en NetMHCpan 4.0 Server. Alelos sombreados son los que son más representativos.

CMH I ANÁLISIS CON ALELOS PERUANOS CON FUERTE				
AFINIDAD DE UNIÓN				
POSICIÓN	PEPTIDE	HLA	SCORE	% RANK
16	LIFXRMISM	HLA-A*26:01	0.298584	0.4042
		HLA-B*08:01	0.497356	0.2451
24	MQIKWKNIY	HLA-B*15:01	0.895795	0.0286
25	QIKWKNIYK	HLA-A*03:01	0.669642	0.179
42	SIWAPSFVF	HLA-B*15:01	0.437954	0.4957
74	DPSSTVTIL	HLA-B*07:02	0.364224	0.4957
103	NRLNSSISY	HLA-B*27:05	0.897201	0.0968
110	SYNSSNDSF	HLA-A*24:02	0.914076	0.0834
146	SVKGGNSTF	HLA-A*26:01	0.505833	0.1726
		HLA-B*07:02	0.436721	0.3914
		HLA-B*15:01	0.905469	0.0244
165	IQGSDSSIY	HLA-B*15:01	0.83842	0.0565
176	GALGGIHAL	HLA-B*39:01	0.460516	0.2728
177	ALGGIHALR	HLA-A*03:01	0.552861	0.3033
194	TEEKNWGSL	HLA-B*40:01	0.576408	0.4563
206	SYNSVDNSW	HLA-A*24:02	0.913267	0.0842

212	NSWQVDQAY	HLA-A*01:04	0.590955	0.3779
		HLA-A*26:01	0.277011	0.4485
214	WQVDQAYAV	HLA-A*02:01	0.518171	0.4928
		HLA-B*39:01	0.613537	0.1417
220	YAVRANQTF	HLA-B*15:01	0.568798	0.292
222	VRANQTFVL	HLA-B*27:05	0.755979	0.2211
		HLA-B*39:01	0.882895	0.0221
223	RANQTFVLF	HLA-B*15:01	0.670297	0.1843
234	SLVGGHERK	HLA-A*03:01	0.644602	0.2032
260	ADFDQNNLL	HLA-B*40:01	0.613699	0.4134
261	DFDQNNLLF	HLA-A*24:02	0.655542	0.3463
266	NLLFKVHQY	HLA-A*26:01	0.285272	0.4315
267	LLFKVHQYF	HLA-B*15:01	0.563861	0.297
273	QYFDHNRHL	HLA-A*24:02	0.935882	0.0564
		HLA-B*39:01	0.32282	0.4828
279	HRLSFTAER	HLA-B*27:05	0.840969	0.1502
280	RLSFTAERF	HLA-B*15:01	0.59457	0.2664
288	FHYNKDTHV	HLA-B*39:01	0.357646	0.4151
289	HYNKDTHVM	HLA-A*24:02	0.626618	0.3798
294	THVMNAPAI	HLA-B*39:01	0.702132	0.0898
295	HVMNAPAIY	HLA-A*03:01	0.450709	0.4599
		HLA-B*15:01	0.886159	0.0332
		HLA-A*26:01	0.861854	0.0178
296	VMNAPAIYF	HLA-A*24:02	0.754032	0.2459

		HLA-B*15:01	0.840391	0.0557
315	SRERFSLSY	HLA-B*27:05	0.728118	0.2437
317	ERFSLSYDY	HLA-B*27:05	0.880352	0.1158
325	YEGSQDTLL	HLA-B*40:01	0.804439	0.2184
338	GQIYWQNQL	HLA-B*39:01	0.321418	0.4855
348	NHILSGNRV	HLA-B*39:01	0.522787	0.2167
355	RVVSPKGNV	HLA-A*03:01	0.468676	0.4276
		HLA-A*26:01	0.278482	0.4454
		HLA-B*15:01	0.769405	0.1083
356	VVSPKGNVYL	HLA-B*08:01	0.428953	0.3288
373	TYGLNTNSI	HLA-A*24:02	0.840966	0.1575
375	GLNTNSIKK	HLA-A*03:01	0.839145	0.0605
433	APDTNSRGF	HLA-B*07:02	0.61032	0.2316
435	DTNSRGFGL	HLA-A*26:01	0.314853	0.3781
437	NSRGFGLAF	HLA-A*26:01	0.319851	0.3705
		HLA-B*15:01	0.594125	0.2668
446	ENEIDFYRY	HLA-A*01:17	0.517134	0.4738
456	VRITPGIRY	HLA-B*27:05	0.949329	0.0486
454	YHVRITPGI	HLA-B*39:01	0.604239	0.1478
490	SSSHFSPK	HLA-A*03:01	0.553898	0.3018
493	SHFSPKLRL	HLA-B*39:01	0.870148	0.0243
501	LEWDIHNQV	HLA-B*40:01	0.919616	0.1093
504	DIHNQVALY	HLA-A*26:01	0.943383	0.0058
510	ALYAQWAQA	HLA-A*02:01	0.544087	0.4448

511	LYAQWAQAF	HLA-A*24:02	0.965327	0.0215
519	FRAPSVSEL	HLA-B*39:01	0.971546	0.0045
		HLA-B*27:05	0.791059	0.1915
520	RAPSVSELY	HLA-B*15:01	0.53639	0.3345
521	APSVSELYL	HLA-B*07:02	0.78335	0.1189
523	SVSELYLNY	HLA-A*03:01	0.521975	0.3467
		HLA-A*26:01	0.81847	0.03
		HLA-B*15:01	0.603539	0.2574
		HLA-A*01:21	0.748127	0.2228
528	YLNYPNPSF	HLA-A*24:02	0.5663	0.4649
		HLA-A*02:01	0.585562	0.376
		HLA-A*26:01	0.295228	0.4111
		HLA-B*15:01	0.787001	0.0952
530	NYINPSFYF	HLA-A*24:02	0.718104	0.2791
531	YINPSFYFR	HLA-A*03:01	0.521743	0.347
556	GVKYGNMNF	HLA-B*15:01	0.729234	0.1363
563	NFGGSFGAF	HLA-A*24:02	0.679836	0.3182
570	AFINDYKNF	HLA-A*24:02	0.886252	0.1098
571	FINDYKNFI	HLA-A*02:01	0.729345	0.2117
590	FRLSREHYV	HLA-B*39:01	0.321501	0.4853
603	VRIFGVETK	HLA-B*27:05	0.845023	0.147
608	VETKAHWNL	HLA-B*40:01	0.87852	0.1554
612	AHWNLDNGL	HLA-B*39:01	0.605808	0.1467
635	DKKEYLSSI	HLA-B*08:01	0.353539	0.456

638	EYLSSIPAL	HLA-A*24:02	0.793292	0.2108
639	YLSSIPALK	HLA-A*03:01	0.876006	0.0382
648	TIFGLGYAK	HLA-A*03:01	0.837616	0.0624
653	GYAKEFWGL	HLA-A*24:02	0.871477	0.1228
656	KEFWGLDFV	HLA-B*40:01	0.841627	0.1852
660	GLDFVLTLA	HLA-A*02:01	0.544268	0.4445
673	KVAKKSSYR	HLA-A*03:01	0.773946	0.1052
678	SSYREVPGY	HLA-A*01:29	0.530067	0.4559
		HLA-A*26:01	0.441101	0.2215
		HLA-B*15:01	0.57059	0.2903
680	YREVPGYSL	HLA-B*27:05	0.81623	0.169
		HLA-B*39:01	0.972155	0.0044
681	REVPGYSLV	HLA-B*40:01	0.949405	0.0693
692	LSWWKPF GK	HLA-A*03:01	0.5483	0.3097
705	IRAGVYNIF	HLA-B*27:05	0.896455	0.0978
		HLA-B*39:01	0.427021	0.31
708	GVYNIFNTK	HLA-A*03:01	0.950857	0.0089
738	YFSQPGRSF	HLA-A*24:02	0.873602	0.1209

Tabla 7

Epítomos de alta afinidad al MHC-I para alelos supertipo en NetMHCpan 4.0 Server. Alelos sombreados son los que son más representativos.

CMH I ANÁLISIS CON ALELOS SUPERTIPO CON FUERTE AFINIDAD				
DE UNIÓN				
POSICIÓN	PEPTIDE	HLA	SCORE	%RANK
1	MQIKWKNIY	HLA-B*15:01	0.895795	0.0286
2	QIKWKNIYK	HLA-A*03:01	0.669642	0.179
13	VALSALSIW	HLA-B*58:01	0.952228	0.0232
19	SIWAPSFVF	HLA-B*15:01	0.437954	0.4957
51	DPSSTVTIL	HLA-B*07:02	0.364224	0.4957
80	NRLNSSISY	HLA-B*27:05	0.897201	0.0968
87	SYNSSNDSF	HLA-A*24:02	0.914076	0.0834
108	TIDGIPLPW	HLA-B*58:01	0.659438	0.273
116	WLNDEARSV	HLA-A*02:01	0.724888	0.2158
123	SVKGGNSTF	HLA-A*26:01	0.505833	0.1726
		HLA-B*07:02	0.436721	0.3914
		HLA-B*15:01	0.905469	0.0244
142	IQGSDSSYI	HLA-B*15:01	0.83842	0.0565
153	GALGGIHAL	HLA-B*39:01	0.460516	0.2728
154	ALGGIHALR	HLA-A*03:01	0.552861	0.3033
162	RTLNPEDLL	HLA-B*58:01	0.551741	0.4272
171	TEEKNWGSL	HLA-B*40:01	0.576408	0.4563
183	SYNSVDNSW	HLA-A*24:02	0.913267	0.0842

189	NSWQVDQAY	HLA-A*01:01	0.590955	0.3779
		HLA-A*26:01	0.277011	0.4485
191	WQVDQAYAV	HLA-A*02:01	0.518171	0.4928
		HLA-B*39:01	0.613537	0.1417
197	YAVRANQTF	HLA-B*58:01	0.857413	0.0822
		HLA-B*15:01	0.568798	0.292
199	VRANQTFVL	HLA-B*27:05	0.755979	0.2211
		HLA-B*39:01	0.882895	0.0221
200	RANQTFVLF	HLA-B*58:01	0.904819	0.0512
		HLA-B*15:01	0.670297	0.1843
211	SLVGGHERK	HLA-A*03:01	0.644602	0.2032
231	RTLANPADF	HLA-B*58:01	0.807525	0.1264
237	ADFDQNNLL	HLA-B*40:01	0.613699	0.4134
238	DFDQNNLLF	HLA-A*24:02	0.655542	0.3463
243	NLLFKVHQY	HLA-A*26:01	0.285272	0.4315
244	LLFKVHQYF	HLA-B*15:01	0.563861	0.297
250	QYFDHNRHL	HLA-A*24:02	0.935882	0.0564
		HLA-B*39:01	0.32282	0.4828
256	HRLSFTAER	HLA-B*27:05	0.840969	0.1502
257	RLSFTAERF	HLA-B*15:01	0.59457	0.2664
265	FHYNKDTHV	HLA-B*39:01	0.357646	0.4151
266	HYNKDTHVM	HLA-A*24:02	0.626618	0.3798
271	THVMNAPAI	HLA-B*39:01	0.702132	0.0898
272	HVMNAPAIY	HLA-A*03:01	0.450709	0.4599

		HLA-A*26:01	0.861854	0.0178
		HLA-B*15:01	0.886159	0.0332
273	VMNAPAIYF	HLA-A*24:02	0.754032	0.2459
		HLA-B*58:01	0.539823	0.4457
		HLA-B*15:01	0.840391	0.0557
292	SRERFSLSY	HLA-B*27:05	0.728118	0.2437
294	ERFSLSYDY	HLA-B*27:05	0.880352	0.1158
302	YEGSQDTLL	HLA-B*40:01	0.804439	0.2184
311	DAFHGQIYW	HLA-B*58:01	0.800205	0.1317
315	GQIYWQNQL	HLA-B*39:01	0.321418	0.4855
325	NHILSGNRV	HLA-B*39:01	0.522787	0.2167
332	RVVSPKGNV	HLA-A*03:01	0.468676	0.4276
		HLA-A*26:01	0.278482	0.4454
		HLA-B*15:01	0.769405	0.1083
333	VVSPKGNYL	HLA-B*08:01	0.428953	0.3288
435	ITPGIRYDW	HLA-B*58:01	0.886874	0.063
350	TYGLNTNSI	HLA-A*24:02	0.840966	0.1575
352	GLNTNSIKK	HLA-A*03:01	0.839145	0.0605
410	APDTNSRGF	HLA-B*07:02	0.61032	0.2316
412	DTNSRGFGL	HLA-A*26:01	0.314853	0.3781
		HLA-B*15:01	0.594125	0.2668
414	NSRGFGLAF	HLA-A*26:01	0.319851	0.3705
423	ENEIDFYRY	HLA-A*01:01	0.517134	0.4738
431	YHVRIPTGI	HLA-B*39:01	0.604239	0.1478

433	VRITPGIRY	HLA-B*27:05	0.949329	0.0486
467	SSSSHFSFK	HLA-A*03:01	0.553898	0.3018
470	SHFSPKLRL	HLA-B*39:01	0.870148	0.0243
472	FSPKLRLEW	HLA-B*58:01	0.800327	0.1316
478	LEWDIHNQV	HLA-B*40:01	0.919616	0.1093
481	DIHNQVALY	HLA-A*26:01	0.943383	0.0058
487	ALYAQWAQA	HLA-A*02:01	0.544087	0.4448
488	LYAQWAQAF	HLA-A*24:02	0.965327	0.0215
496	FRAPSVSEL	HLA-B*27:05	0.791059	0.1915
		HLA-B*39:01	0.971546	0.0045
497	RAPSVSELY	HLA-B*58:01	0.774954	0.1499
		HLA-B*15:01	0.53639	0.3345
498	APSVSELYL	HLA-B*07:02	0.78335	0.1189
500	SVSELYLNY	HLA-A*01:01	0.748127	0.2228
		HLA-A*26:01	0.81847	0.03
		HLA-B*15:01	0.603539	0.2574
505	YLNYINPSF	HLA-A*02:01	0.585562	0.376
		HLA-A*24:02	0.5663	0.4649
		HLA-A*26:01	0.295228	0.4111
		HLA-B*15:01	0.787001	0.0952
507	NYINPSFY	HLA-A*24:02	0.718104	0.2791
508	YINPSFYR	HLA-A*03:01	0.521743	0.347
533	GVKYGNMNF	HLA-B*15:01	0.729234	0.1363
540	NFGGSFGAF	HLA-A*24:02	0.679836	0.3182

547	AFINDYKNF	HLA-A*24:02	0.886252	0.1098
548	FINDYKNFI	HLA-A*02:01	0.729345	0.2117
567	FRLSREHYV	HLA-B*39:01	0.321501	0.4853
580	VRIFGVETK	HLA-B*27:05	0.845023	0.147
583	FGVETKAHW	HLA-B*58:01	0.769995	0.1544
585	VETKAHWNL	HLA-B*40:01	0.87852	0.1554
589	AHWNLDNGL	HLA-B*39:01	0.605808	0.1467
612	DKKEYLSSI	HLA-B*08:01	0.35359	0.456
615	EYLSSIPAL	HLA-A*24:02	0.793292	0.2108
616	YLSSIPALK	HLA-A*03:01	0.876006	0.0382
618	SSIPALKTI	HLA-B*58:01	0.705894	0.2211
625	TIFGLGYAK	HLA-A*03:01	0.837616	0.0624
630	GYAKEFWGL	HLA-A*24:02	0.871477	0.1228
633	KEFWGLDFV	HLA-B*40:01	0.841627	0.1852
637	GLDFVLTLA	HLA-A*02:01	0.544268	0.4445
650	KVAKKSSYR	HLA-A*03:01	0.773946	0.1052
655	SSYREVPGY	HLA-A*01:01	0.530067	0.4559
		HLA-A*26:01	0.441101	0.2215
		HLA-B*58:01	0.65484	0.2793
		HLA-B*15:01	0.57059	0.2903
657	YREVPGYSL	HLA-B*27:05	0.81623	0.169
		HLA-B*39:01	0.972155	0.0044
658	REVPGYSLV	HLA-B*40:01	0.949405	0.0693
663	YSLVDVLSW	HLA-B*58:01	0.964294	0.0179

664	SLVDVLSWW	HLA-B*58:01	0.5558	0.4209
669	LSWWKPF GK	HLA-A*03:01	0.5483	0.3097
682	IRAGVYNIF	HLA-B*27:05	0.896455	0.0978
		HLA-B*39:01	0.427021	0.31
685	GVYNIFNTK	HLA-A*03:01	0.950857	0.0089
687	YNIFNTKYW	HLA-B*58:01	0.5804	0.3842
715	YFSQPGRSF	HLA-A*24:02	0.873602	0.1209

Tabla 8

Epítomos de alta afinidad al MHC-II para alelos peruanos en NetMHCpan 4.0 Server. Alelos sombreados son los que son más representativos.

CMH I ANÁLISIS CON ALELOS SUPERTIPO CON FUERTE AFINIDAD DE UNIÓN				
POSICIÓN	PEPTIDE	HLA	SCORE	%RANK
3	IKWKNIYKSCVALSA	DRB1_0401	YKSCVALSA	1.6
4	KWKNIYKSCVALSAL	DRB1_0101	YKSCVALSA	1.4
		DRB1_0401	YKSCVALSA	0.7
5	WKNIYKSCVALSALS	DRB1_0101	YKSCVALSA	1
		DRB1_0401	YKSCVALSA	0.4
6	KNIYKSCVALSALSI	DRB1_0101	YKSCVALSA	0.5
		DRB1_0401	YKSCVALSA	0.4
		DRB1_0701	CVALSALSI	1.1
7	NIYKSCVALSALSIW	DRB1_0101	YKSCVALSA	0.7
		DRB1_0401	YKSCVALSA	1.1
		DRB1_0701	CVALSALSI	1.6
8	IYKSCVALSALSIIWA	DRB1_0101	CVALSALSI	1
		DRB1_0701	CVALSALSI	2
93	DSFIVRGLDANRVLT	DRB1_0101	VRGLDANRV	1.8
94	SFIVRGLDANRVLTT	DRB1_0101	VRGLDANRV	1.6
155	LGGIIALRTLNPEDL	DRB1_0401	IIALRTLNP	1.9
427	DFYRYHVRITPGIRY	DRB1_0801	YRYHVRITP	1.7
428	FYRYHVRITPGIRYD	DRB1_0801	YRYHVRITP	1.6

475	KLRLEWDIHNQVALY	DRB1_0301	LEWDIHNQV	2
499	PSVSELYLNYINPSF	DRB1_0401	LYLNYINPS	2
500	SVSELYLNYINPSFY	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.8
501	VSELYLNYINPSFY	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.5
502	SELYLNYINPSFYR	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.5
503	ELYLNYINPSFYRA	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.9
564	SREFRLSREHYVNRA	DRB1_0701	FRLSREHYV	1.8
610	DLDKKEYLSSIPALK	DRB1_0101	YLSSIPALK	2
611	LDKKEYLSSIPALKT	DRB1_0101	YLSSIPALK	0.3
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.5
		DRB1_0701	LSSIPALKT	1.1
612	DKKEYLSSIPALKTI	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.06
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.15
		DRB1_0701	LSSIPALKT	0.5
		DRB1_0801	YLSSIPALK	1.2
613	KKEYLSSIPALKTIF	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.3
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.09
		DRB1_0701	LSSIPALKT	0.25
		DRB1_0801	LSSIPALKT	0.6
614	KEYLSSIPALKTIFG	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.05
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.17
		DRB1_0701	LSSIPALKT	0.5
		DRB1_0801	LSSIPALKT	1
615	EYLSSIPALKTIFGL	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.25

		DRB1_0401	LSSIPALKT	0.7
		DRB1_0701	LSSIPALKT	1.4
616	YLSSIPALKTIFGLG	DRB1_0101	LSSIPALKT	1
634	EFWGLDFVLTAAKN	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.8
		DRB1_0401	FVLTAAKN	1.5
		DRB1_0701	FVLTAAKN	1.3
635	FWGLDFVLTAAKND	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.4
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.8
		DRB1_0701	FVLTAAKN	1.4
636	WGLDFVLTAAKNDK	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.2
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.5
		DRB1_0701	FVLTAAKN	1.2
		DRB1_0801	FVLTAAKN	1.7
637	GLDFVLTAAKNDKV	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.15
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.4
		DRB1_0701	FVLTAAKN	0.9
		DRB1_0801	FVLTAAKN	1.1
638	LDFVLTAAKNDKVA	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.25
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.7
		DRB1_0701	FVLTAAKN	1.2
		DRB1_0801	FVLTAAKN	1.3
639	DFVLTAAKNDKVAK	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.6
		DRB1_0401	FVLTAAKN	1.7

Tabla 9

Epítomos de alta afinidad al MHC-II para alelos supertipo en NetMHCpan 4.0 Server. Alelos sombreados son los que son más representativos.

CMH II ANÁLISIS CON ALELOS SUPERTIPOS CON FUERTE AFINIDAD				
DE UNIÓN				
POSICIÓN	PEPTIDE	HLA	SCORE	%RANK
3	IKWKNIYKSCVALSA	DRB1_0401	YKSCVALSA	1.6
4	KWKNIYKSCVALSAL	DRB1_0101	YKSCVALSA	1.4
		DRB1_0401	YKSCVALSA	0.7
5	WKNIYKSCVALSALS	DRB1_0101	YKSCVALSA	1
		DRB1_0401	YKSCVALSA	0.4
6	KNIYKSCVALSALSI	DRB1_0101	YKSCVALSA	0.5
		DRB1_0401	YKSCVALSA	0.4
		DRB1_0701	CVALSALSI	1.1
7	NIYKSCVALSALSIW	DRB1_0101	YKSCVALSA	0.7
		DRB1_0401	YKSCVALSA	1.1
		DRB1_0701	CVALSALSI	1.6
8	IYKSCVALSALSIIWA	DRB1_0101	CVALSALSI	1
		DRB1_0701	CVALSALSI	2
93	DSFIVRGLDANRVLT	DRB1_0101	VRGLDANR	1.8
			V	
94	SFIVRGLDANRVLTT	DRB1_0101	VRGLDANR	1.6
			V	

155	LGGIHALRTLNPEDL	DRB1_0401	IHALRTLNP	1.9
427	DFYRYHVRITPGIRY	DRB1_0801	YRYHVRITP	1.7
428	FYRYHVRITPGIRYD	DRB1_0801	YRYHVRITP	1.6
475	KLRLEWDIHNQVALY	DRB1_0301	LEWDIHNQ	2
			V	
499	PSVSELYLNYINPSF	DRB1_0401	LYLNYINPS	2
500	SVSELYLNYINPSFY	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.8
501	VSELYLNYINPSFY	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.5
502	SELYLNYINPSFYR	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.5
503	ELYLNYINPSFYRA	DRB1_0401	LYLNYINPS	0.9
564	SREFRLSREHYVNRA	DRB1_0701		1.8
			FRLSREHYV	
610	DLDKKEYLSSIPALK	DRB1_0101	YLSSIPALK	2
611	LDKKEYLSSIPALKT	DRB1_0101	YLSSIPALK	0.3
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.5
		DRB1_0701	LSSIPALKT	1.1
612	DKKEYLSSIPALKTI	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.06
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.15
		DRB1_0701	LSSIPALKT	0.5
		DRB1_0801	YLSSIPALK	1.2
613	KKEYLSSIPALKTIF	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.3
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.09
		DRB1_0701	LSSIPALKT	0.25
		DRB1_0801	LSSIPALKT	0.6

614	KEYLSSIPALKTIFG	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.05
		DRB1_0401	YLSSIPALK	0.17
		DRB1_0701	LSSIPALKT	0.5
		DRB1_0801	LSSIPALKT	1
615	EYLSSIPALKTIFGL	DRB1_0101	LSSIPALKT	0.25
		DRB1_0401	LSSIPALKT	0.7
		DRB1_0701	LSSIPALKT	1.4
616	YLSSIPALKTIFGLG	DRB1_0101	LSSIPALKT	1
634	EFWGLDFVLTAAKN	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.8
		DRB1_0401	FVLTAAKN	1.5
		DRB1_0701	FVLTAAKN	1.3
635	FWGLDFVLTAAKND	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.4
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.8
		DRB1_0701	FVLTAAKN	1.4
636	WGLDFVLTAAKNDK	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.2
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.5
		DRB1_0701	FVLTAAKN	1.2
		DRB1_0801	FVLTAAKN	1.7
637	GLDFVLTAAKNDKV	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.15
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.4
		DRB1_0701	FVLTAAKN	0.9
		DRB1_0801	FVLTAAKN	1.1
638	LDFVLTAAKNDKVA	DRB1_0101	FVLTAAKN	0.25
		DRB1_0401	FVLTAAKN	0.7

		DRB1_0701	FVLTLAAKN	1.2
		DRB1_0801	FVLTLAAKN	1.3
639	DFVLTLAAKNDKVAK	DRB1_0101	FVLTLAAKN	0.6
		DRB1_0401	FVLTLAAKN	1.7

Tabla 10.

Epítomos presentes en la proteína con una alta afinidad para estimular los linfocitos T citotóxico mediante CTLPred.

POSICIÓN	EPITOPE	UBICACIÓN ESPACIAL
25	FVFAQNNDE	N.U.
73	VSDVHDVNR	TRANS
400	CAFLHTNQS	N.U.
55	TVTILTDRQ	N.U.
166	PEDLLTEEK	INTRA
232	TLANPADFD	EXTRA
271	THVMNAPAI	EXTRA
366	TTNTLQLAI	TRANS
454	YGKVPISQK	N.U.
488	LYAQWAQAF	TRANS
505	YLNINPSF	EXTRA
560	DKGPSREFR	EXTRA
588	KAHWNLDNG	INTRA

668	VLSWWKPFQ	TRANS
26	VFAQNNDEG	N.U.
109	IDGIPLPWL	TRANS
146	DSSIYGSGA	TRANS
370	LQLAINIFE	TRANS
520	PDLKPETSN	EXTRA
576	NRAHVRIFG	EXTRA
585	VETKAHWNL	TRANS
686	VYNIFNTKY	EXTRA
22	APSFVFAQN	N.U.
23	PSFVFAQNN	N.U.
448	PQETASYGK	EXTRA
486	VALYAQWAQ	TRANS
43	VIEGKQDLQ	TRANS
62	RQTAQNIEQ	TRANS
145	SDSSIYGSG	TRANS
212	LVGGHERKN	EXTRA
220	NMGSIGDYG	N.U.
316	QIYWQNQLN	EXTRA/TRANS
598	HSDFSLSYA	TRANS
2	QIKWKNIYK	N.U.
135	TLSTFDLIQ	TRANS
205	FVLFQGSQV	TRANS
502	SELYLNYIN	EXTRA

75	DVHDEVNRLN	TRANS
149	IYGSGALGG	TRANS/EXTRA
343	DNQIRNTTY	N.U.
450	ETASYGKVP	N.U.
455	GKVPISQKL	N.U.
476	LRLEWDIHN	TRANS
683	RAGVYNIFN	TRANS
30	NNDEGSVTD	N.U.
175	NWGLTKGS	INTRA
295	RFSLSYDYE	TRANS
379	SKFHQYASG	EXTRA
428	FYRYHVRIT	INTRA
491	QWAQAFRAP	TRANS/EXTRA

Figura 4

Es el análisis Ramachandra de pdb Phyre2

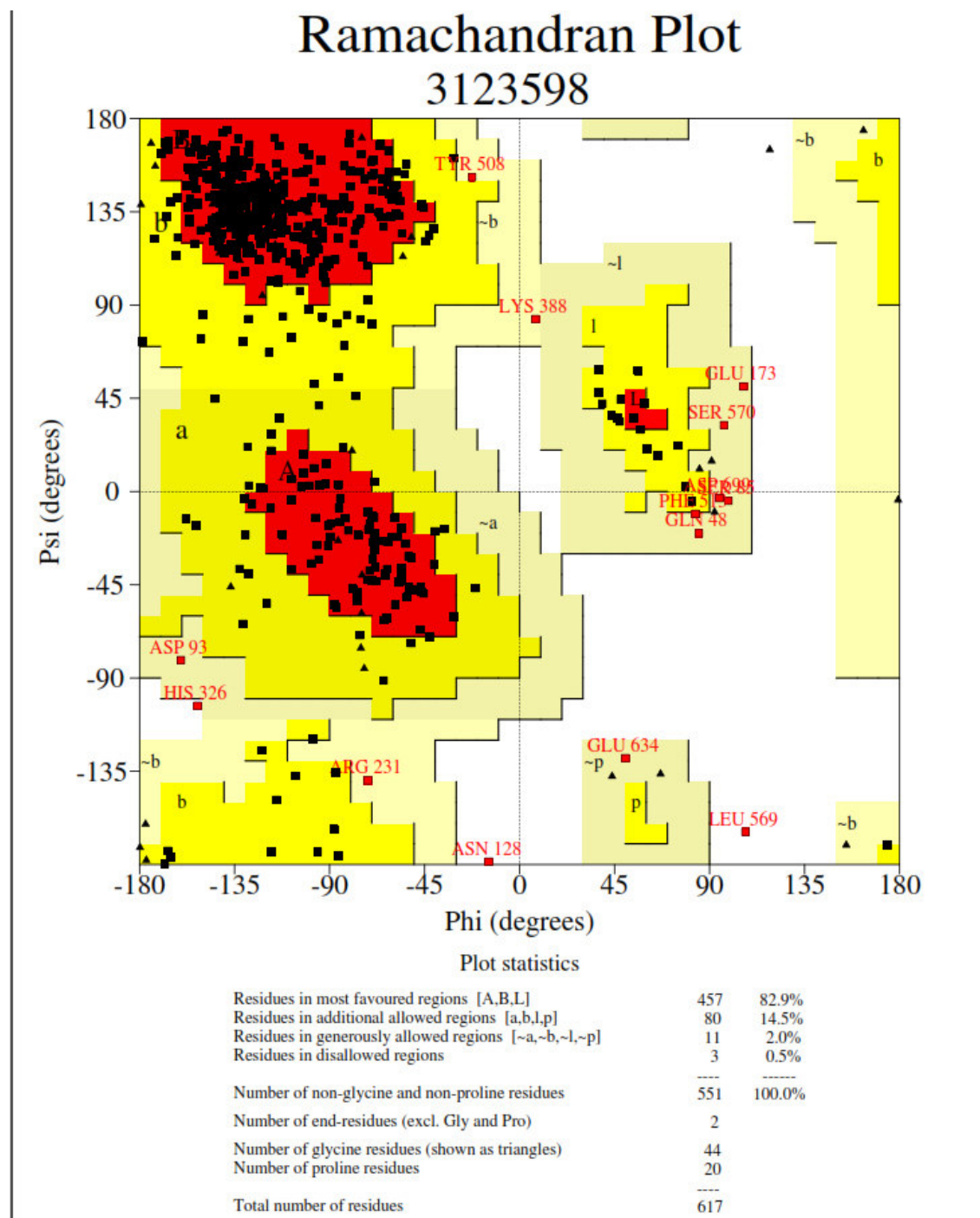


Figura 5

Es el análisis Ramachandra de pdb Itasser

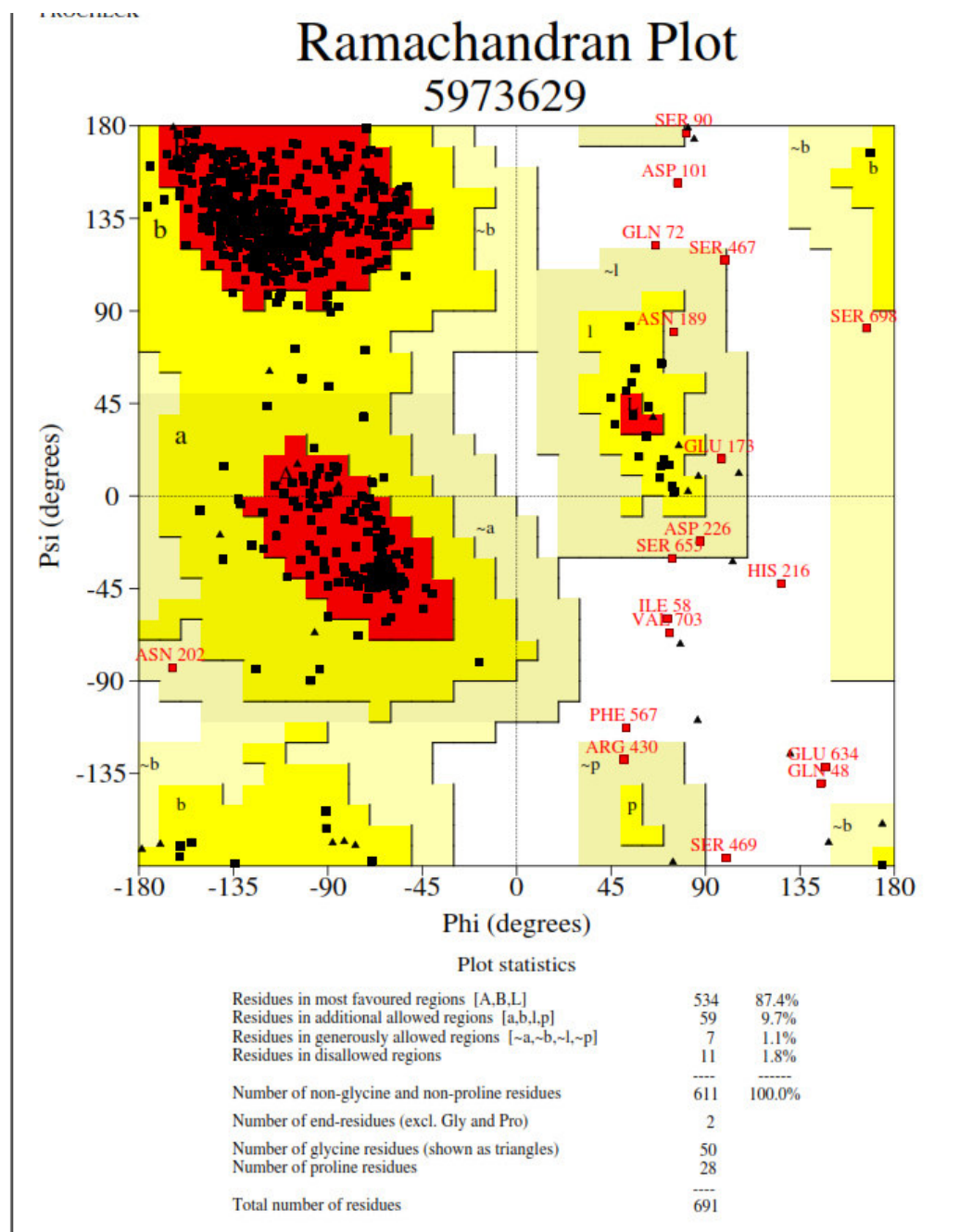


Figura 6

Es el análisis Ramachandra de pdb Galaxy refine

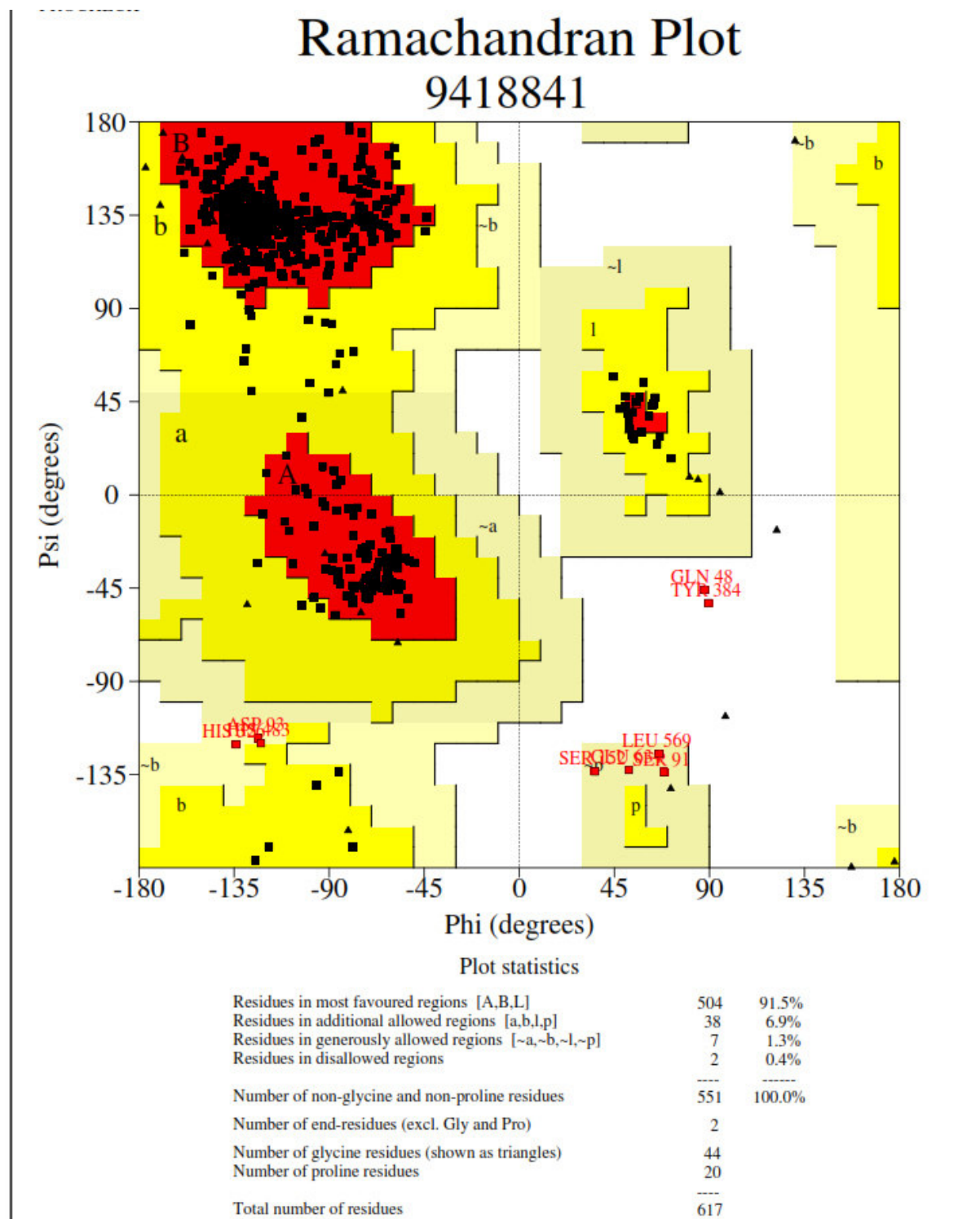


Figura 7

Pro SAID después de KOBAMIN

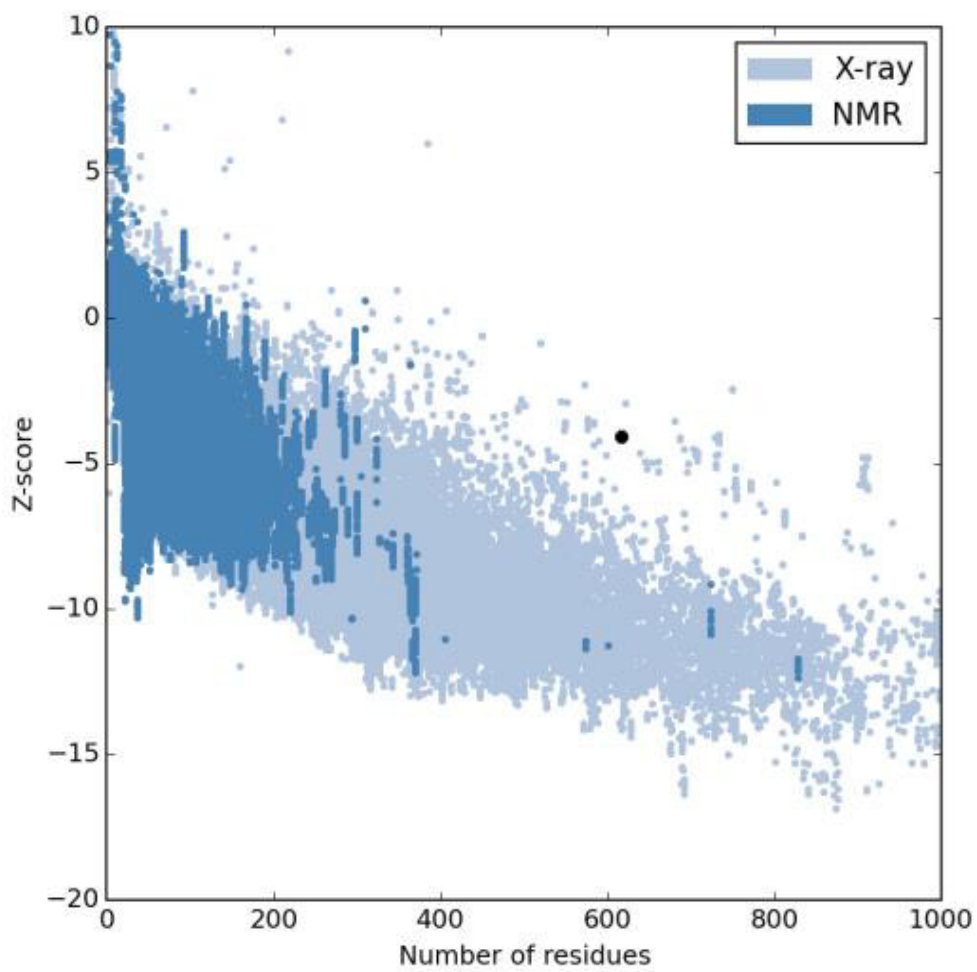


Tabla 11*Epítomos de células B mediante BCPREDS Server 1.0.*

POSICIÓN	EPITOPO	SCORE	UBICACION
N			
174	KNWGSLTKGSYNSVDNSWQV	0.996	INTRA
352	GLNTNSIKKVDIGTTTNTLQ	0.996	INTRA
434	RITPGIRYDWYTHNPQETAS	0.975	TRANS
512	SFYRAGNPDLKPETSNGYD	0.972	EXTRA
694	YWNASDLPSVSPRGESPLPK	0.945	EXTRA/TRANS
118	NDEARSVKGGNSTFDENTLS	0.939	EXTRA/TRANS
399	GCAFLHTNQSDAPDTNSRGF	0.883	EXTRA
457	VPISQKLPSKSSSSHFSPLK	0.877	EXTRA/TRANS
261	TAER FHYNKDTHVMNAPAIY	0.795	EXTRA/TRANS
378	ESKFHQYASGKDNCHLPENA	0.776	EXTRA
36	VTDLKSIVIEGKQDLDPSSST	0.747	INTRA
219	KNM GSIGDYGTKRTL ANPAD	0.73	EXTRA/TRANS
61	DRQTAQNIEQKQVSDVHDVN	0.73	TRANS

Tabla 12

Lista de Epitopes conformacionales de la proteína RDTonB analizados por el servidor ElliPro

	POSICION		PEPTIDO	N~ RESI DUOS	SCORE	UBICACIÓN ESPACIAL	COLOR
	INICIO	FINAL					
1	559	581	VDKGPSREFRLSREHY VNRAHVR	23	0.78	EXTRA	MAGENTA
2	591	599	WNLDNGLHS	9	0.755	TRANS/ INTRA	-
3	629	644	LGYAKEFWGLDFVLT	16	0.747	INTRA	-
4	246	260	FKVHQYFDHNRHSF	15	0.742	TRANS / INTRA	-
5	278	291	AIYFPESVHEENKK	14	0.723	EXTRA	GREEN
6	505	524	YLNINPSFYRAGNP DLKP	20	0.72	EXTRA	AZUL
7	299	317	SYDYEGSQDTLLDAFH GQI	19	0.705	TRANS / INTRA	-
8	609	616	KDLDKKEY	8	0.704	EXTRA	AMARILLO
9	354	376	NTNSIKKVDIGTTNTL QLAINI	23	0.696	TRANS / INTRA	-

10	476	492	LRLEWDIHNQVALYA QW	17	0.682	TRANS / INTRA	-
11	170	208	LTEEKNWGS�TKGSYN SVDNSWQVDQAYAVR ANQTFVLF	39	0.677	TRANS / INTRA	-
12	648	696	NDKVAKKSSYREVPG YSLVDVLSWWKPF GK DGLTIRAGVYNIFNTK YWN	49	0.677	EXTRA/TRAN S/INTRA	ANARAJAN DO
13	382	472	HQYASGKPDNSRGF GLAFENEIDFYRYHVRI TPGIRYDWYTHNPQE TSKSSSSH F	56	0.625	EXTRA/TRAN S/INTRA	MARRON
14	530	545	YDLGVKYGNMNFGGS F	16	0.621	TRANS / INTRA	-
15	325	329	NHILS	5	0.62	EXTRA	CYNAS
16	719	731	PGRSFKVSFVQKF	13	0.62	TRANS / INTRA	-
17	216	240	HDYGTKRTL ANPADF D	16	0.616	EXTRA	CYANS