



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**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

AUTOR

Astrid Carolina FLORES NUÑEZ

ASESOR

Mg. Gustavo Adolfo SANDOVAL PEÑA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Flores, A. (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. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (opcional):

0000-0003-0353-3091 (Bach. Astrid Carolina Flores Nuñez)

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0002-8392-9880 (Asesor: Mg. Gustavo Adolfo Sandoval)

0000-0002-0562-0431 (Asesor externo: Blgo. Carlos Patricio Padilla Rojas)

DNI del autor:

70448543

Grupo de investigación:

GRUPO DE INVESTIGACION EN BIOINFORMÁTICA Y BIOLOGÍA ESTRUCTURAL

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) de acuerdo al Convenio 306-PNICP-PIAP-2015, y por el Programa de Promoción de Tesis de Pregrado y Posgrado 2017 – II del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (código: B17100214b).

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas:

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, Av. Defensores del Morro 2268 (Ex Huaylas) - Chorrillos, Lima 9 (12°10'51.1"S 77°00'47.1"W).

Año o rango de años que la investigación abordó:

2017-2018



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las *10:00* horas del 23 de agosto de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **ASTRID CAROLINA FLORES NUÑEZ**.

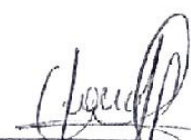
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 003-EPGB-2019, la titulando expuso su tesis: **“CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN EN SISTEMA PROCARIÓTICO DEL DOMINIO EXTRACELULAR DE LA PROTEÍNA DE ENSAMBLAJE DE LIPOPOLISACÁRIDOS-D (LptD) DE *Bartonella bacilliformis*”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota *19*, calificativo: *Aprobada con máximos honores*


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **ASTRID CAROLINA FLORES NUÑEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las *11:20* horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de agosto de 2019.


Mg. FERNANDO RETUERTO PRIETO
(PRESIDENTE)


Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA
(ASESOR)


Mg. EDITH RODRIGUEZ QUISPE
(MIEMBRO)


Mg. RUTH GARCÍA DE LA GUARDA
(MIEMBRO)

Esta investigación fue financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) de acuerdo al Convenio 306-PNICP-PIAP-2015, y por el Programa de Promoción de Tesis de Pregrado y Posgrado 2017 – II del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (código: B17100214b).

DEDICATORIA

*A mi amada madre
Consuelo Nuñez Altamirano,
por su fuerza, por sus consejos
y amor incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mi madre Consuelo Nuñez Altamirano por cuidarme y educarme con amor, por su gran esfuerzo y por su inmenso amor de madre, así mismo por enseñarme con el ejemplo a dar lo mejor de mí.

Agradezco a mis asesores Blgo. Carlos Patricio Padilla Rojas y Mg. Gustavo Adolfo Sandoval Peña y revisores Dra. Ruth García y Dra. Edith Rodríguez por su constante apoyo y correcciones en la elaboración de la tesis. Gracias Carlos por enseñarme a desenvolverme mejor en el laboratorio, por tus enseñanzas que me enriquecen como profesional. Gracias Mg. Gustavo Sandoval por adentrarnos en el mundo de la Bioinformática a muchos estudiantes y enseñarnos la importancia del análisis *in silico*, sus clases fueron de mucho provecho para poder llevar a cabo la primera parte de la tesis, así mismo agradecer su apoyo mostrado durante todo el desarrollo de la tesis. A David García por su gran amistad, por siempre apoyarme en el laboratorio, por guiarme en los ensayos, así como por su singular simpatía y saber que algo andaba mal en mí sin necesidad de decirle nada. Al Dr. Omar Cáceres, Dr. Henri Bailon y Tec. Lab. Juana Choque por su apoyo al proyecto de investigación. De igual manera agradecer a mis compañeras del proyecto, Cleidy Osorio y Lisbet Inga, por su invaluable ayuda y guía en el laboratorio, así por su amistad durante este periodo de la realización del trabajo de tesis. También agradecer a mis compañeros: Gaby Colque, José, Verónica, Mary por los momentos gratos vividos. A Anibal Cabrera y Milagros Grande por su gran amistad, por darme apoyo y ánimos ante momentos difíciles, los quiero mucho. A Jhon Leiva por ser mi amigo desde pregrado y también en el laboratorio del INS, por darnos mutuamente fuerza para continuar nuestros largos experimentos.

Quiero extender un sincero agradecimiento a todos mis profesores de pregrado y a mi alma máter, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por permitirme formarme

como una profesional y darme las herramientas necesarias para seguir superándome día tras día. Agradezco a mis amigos de Genética y Biotecnología 12, por compartir conmigo inolvidables momentos durante nuestra etapa de pregrado y al profesor Retuerto, “qué terrible”, que fue uno de los profesores del primer semestre de carrera, con él comenzó todo el amor hacia la ciencia con el curso Tópicos en Biología y ahora culminó ésta etapa siendo él el presidente de Jurado de Tesis, muchas gracias por todo lo enseñado profesor.

Agradezco profundamente al PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN PARA LA COMPETITIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD (Innóvate Perú) por el financiamiento otorgado de acuerdo al Convenio 306-PNICP-PIAP-2015, sin el cual no hubiera sido posible realizar la presente tesis.

Así mismo, agradezco al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS), por brindarnos las instalaciones del Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular (LBBM) totalmente equipado para cumplir los objetivos de la presente tesis, y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento bajo la modalidad de Promoción de Tesis de pre grado 2017-II código B17100214b.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1. Enfermedad de Carrión	3
2.2. <i>Bartonella bacilliformis</i>	5
2.3. Antigenicidad de <i>Bartonella bacilliformis</i>	6
2.4. Vacunología reversa	8
2.5. Sistema pET-28a(+)	10
2.6. Sistema de clonamiento <i>E. coli</i> TOP10	10
2.7. Sistema de expresión <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	12
2.8. Mecanismo de inducción por IPTG	12
2.9. Purificación de proteínas por cola de histidina	14
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
3.1. Hipótesis	16
3.2. Objetivos	16
3.2.1. Objetivo general	16
3.2.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Análisis bioinformático	17
4.1.1. Selección del genoma y proteoma de <i>Bartonella bacilliformis</i>	17

4.1.2 Selección de la proteína LptD de <i>Bartonella bacilliformis</i>	17
4.1.3 Caracterización y modelización proteica.....	18
4.1.4 Identificación de epítopes.....	19
4.1.5 Evaluación de toxicidad proteica.....	19
4.1.6 Selección de los péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II.....	20
4.1.7 Cobertura de protección poblacional de los péptidos de unión fuerte a HLA-I HLA-II.....	20
4.2 Elaboración de primers.....	21
4.3 Cultivo de <i>Bartonella bacilliformis</i>	22
4.4 Extracción y purificación de ADN genómico de <i>Bartonella bacilliformis</i>	23
4.5 Amplificación del gen lptD.....	24
4.6 Clonamiento del gen lptD.....	25
4.6.1. Digestión con enzimas de restricción.....	25
4.6.2 Purificación del plásmido y del inserto.....	25
4.6.3 Ligación de pET28a(+) y del inserto LptD.....	26
4.7 Células químicamente competentes.....	27
4.8 Transformación.....	27
4.9 Extracción y purificación de plásmidos.....	28
4.10 Secuenciamiento.....	29
4.11 PCR colonia.....	30
4.12 Preparación de medios de cultivo.....	30
4.13 Criopreservación.....	31
4.14 Inducción con IPTG.....	31
4.15 Purificación de la proteína recombinante.....	32
4.15.1 Lisado del cultivo inducido.....	32
4.15.2 Purificación por afinidad.....	34

4.15.3 Cuantificación de proteínas por Bradford	35
4.15.4 Electroforesis en condiciones denaturantes (PAGE-SDS)	35
4.16 Western Blot	38
5. ESQUEMA RESUMIDO SOBRE LA METODOLOGÍA	40
6. RESULTADOS.....	41
6.1 Análisis bioinformático.....	41
6.1.1 Proteínas de membrana externa de <i>Bartonella bacilliformis</i>	41
6.1.2 Caracterización y modelización de LptD.....	43
6.1.3 Identificación de epítopes del dominio extracelular de LptD.....	48
6.1.4 Evaluación de toxicidad del dominio extracelular de LptD.....	52
6.1.5 Cobertura de protección poblacional de los péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II.....	53
6.2 Cultivo de <i>B. bacilliformis</i>	53
6.3 Extracción de ADN genómico de <i>B. bacilliformis</i>	55
6.4 Optimización del PCR del gen lptD.....	56
6.5 Clonamiento y Transformación en <i>Escherichia coli</i> TOP10	56
6.6 Extracción y Purificación de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> TOP10-rLptD.....	59
6.7 Secuenciamiento.....	60
6.8 Transformación en <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	61
6.9 Expresión y purificación de LptD recombinante	63
6.10 Western Blot.....	68
7. DISCUSIÓN	69
7.1 Análisis <i>in silico</i>	70
7.2 Expresión y antigenicidad de LptD recombinante	73
8. CONCLUSIONES	79
9. RECOMENDACIONES	80

10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	81
11. ANEXOS	93

i. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleósido trifosfato
EC	Enfermedad de Carrión
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Gen lptD	Gen de la proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos – D
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LptD	Proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos – D
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
°C	Grados Celsius
g	Gravedades
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pb	Pares de bases
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro
μ L	Microlitro
μ g	Microgramo
μ M	Micromolar
SDS	Dodecil sulfato de Sodio

TAE

Tris-acetato-EDTA

Méio TB

Medio Terrific Broth

V

Voltios

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa circular del Plásmido pET-28a(+)	11
FIGURA 2. Sistema de Expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS mediada por la inducción con IPTG	14
FIGURA 3. Resina níquel-NTA y Ni-NTA.	15
FIGURA 4. Gráfica de la curva patrón para la cuantificación de proteínas mediante bradford	35
FIGURA 5. Protocolo de lisado y obtención de proteínas del cultivo inducido	37
FIGURA 6. Protocolo de purificación de proteínas por cromatografía de afinidad	38
FIGURA 7. Modelo tridimensional de la proteína LptD	45
FIGURA 8. Modelo 3D del dominio extracelular de LptD	46
FIGURA 9. Ubicación de las regiones desordenadas del dominio extracelular de LptD ..	47
FIGURA 10. Epítopes lineales del dominio extracelular de LptD	51
FIGURA 11. Epítopes conformacionales del dominio extracelular de LptD	52
FIGURA 12. Cultivo de <i>B. bacilliformis</i>	53
FIGURA 13. ADN genómico de <i>B. bacilliformis</i>	55
FIGURA 14. PCR. Curva de optimización de temperaturas de hibridación	56
FIGURA 15. Mapa del plásmido <i>pET 28a(+)</i> – <i>rLptD</i>	57
FIGURA 16. <i>E. coli</i> TOP10 transformadas	58
FIGURA 17. PCR de <i>E. coli</i> TOP10 – <i>rLptD</i>	59
FIGURA 18. ADN plasmídico <i>pET 28a(+)</i> – <i>rLptD</i>	60
FIGURA 19. Secuenciamiento del gen <i>lptD</i> que codifica el dominio extracelular	61
FIGURA 20. Placas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS– <i>rLptD</i>	62
FIGURA 21. PCR de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS– <i>rLptD</i>	62
FIGURA 22. Inducción a diferentes concentraciones de IPTG	64

FIGURA 23. Inducción a diferentes tiempos y medios de cultivo.....	65
FIGURA 24. Inducción a diferentes temperaturas	65
FIGURA 25. Inducción a diferentes concentraciones de etanol.....	66
FIGURA 26. Purificación parcial de la proteína recombinante LptD condiciones denaturantes y no denaturantes.....	67
FIGURA 27. Western Blot	68
FIGURA 28. Sistema de transporte de LPS en bacterias gram negativas	71

iii. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. HLA-I y HLA-II más frecuentes en la población peruana	21
TABLA 2. Secuencia de primers para la amplificación de la secuencia génica del dominio extracelular de la proteína LptD.....	22
TABLA 3. Composición del medio bifásico de cultivo	22
TABLA 4. Reactivos para la digestión del plásmido pET28a(+)	25
TABLA 5. Reactivos para la reacción de ligación	26
TABLA 6. Reactivos para la reacción de autoligado	26
TABLA 7. Reactivos para el mix de secuenciamiento.....	29
TABLA 8. Composición de medios de cultivo	31
TABLA 9. Parámetros de optimización	33
TABLA 10. Buffers para la purificación con resina His60 Ni Superflow (Clontech)	34
TABLA 11. Lista de proteínas localizadas en la membrana externa de <i>B. bacilliformis</i> ...	42
TABLA 12. Criterios de selección de la proteína LptD	43
TABLA 13. Características de la proteína LptD (mediante software ProtParam)	44
TABLA 14. Propiedades del dominio extracelular de LptD	48
TABLA 15. Análisis de Ramachandran del modelo 3D del dominio extracelular de LptD	48
TABLA 16. Epítopes lineales del dominio extracelular de LptD	49
TABLA 17. Epítopes conformacionales del dominio extracelular de LptD.....	50
TABLA 18. Péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II.....	54
TABLA 19. Cobertura Poblacional de los péptidos dominantes de unión a HLA clase I y clase II.....	55

iv. RESUMEN

Bartonella bacilliformis es el agente etiológico de la enfermedad de Carrión. El estudio del potencial antigénico de proteínas de membrana de *B. bacilliformis* es de importancia, debido a que actualmente no se cuenta con una vacuna contra esta enfermedad. El objetivo de la presente tesis fue evaluar *in silico* y serológicamente el potencial antigénico del dominio extracelular recombinante de la proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos - D (LptD) de *Bartonella bacilliformis*. Por medio del análisis *in silico* se escogió a la proteína LptD por estar localizado en la membrana externa, poseer una alta probabilidad de ser antigénica, no presentar similitud con proteínas humanas, de ratón o de cerdo, ser una proteína de mediano peso molecular (86.80 kDa), presentar epítopes con alta afinidad a HLA clase I y II, los cuales, presentaron un alto índice de cobertura poblacional (Perú 100%, Sudamérica 93.8% y a nivel Mundial 99.28%). Mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante se clonó en *Escherichia coli* TOP10 el gen del dominio extracelular de LptD fusionada a una cola de seis histidinas y se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Las condiciones para inducción de la proteína recombinante fueron 0.5 mM IPTG, 16 horas, medio TB etanol al 3% (v/v), 28 °C, OD₆₀₀: 1-1.5 y 200 r.p.m. La purificación se realizó en condiciones denaturantes con resina Ni-IDA (His60 Ni Superflow) a pequeña escala y se obtuvo 2.6 µg de LptD recombinante parcialmente purificada por cada 1 mL de cultivo bacteriano inducido (OD₆₀₀: 1 - 1.5). El resultado positivo del ensayo de Western Blot permitió evidenciar la antigenicidad de la proteína LptD recombinante ante sueros de pacientes que sufrieron la enfermedad de Carrión. En conclusión, la proteína LptD recombinante muestra antigenicidad tanto *in silico* y serológicamente, estos resultados son base para posteriores estudios de la proteína LptD en la línea de investigación de candidatos vacunales contra la enfermedad de Carrión.

Palabras clave: Enfermedad de Carrión, proteína LptD, *Bartonella bacilliformis*, proteína recombinante, antigenicidad.

v. ABSTRACT

Bartonella bacilliformis is the etiological agent of Carrion's disease. The study of the antigenic potential of membrane proteins of *B. bacilliformis* is of importance, because there is currently no vaccine against this disease. The objective of this thesis was to evaluate, *in silico* and serologically, the antigenic potential of the recombinant extracellular domain of the lipopolysaccharide - D (LptD) assembly protein of *Bartonella bacilliformis*. By means of *in silico* analysis, the LptD protein was chosen because it was located in the outer membrane, possessed a high probability of being antigenic, not showing similarity with human, mouse or pig proteins, being a medium molecular weight protein (86.80 kDa), present epitopes with high affinity to HLA class I and II, which presented a high rate of population coverage (Peru 100%, South America 93.8% and World level 99.28%). Through the use of recombinant DNA technology, the extracellular domain gene of LptD fused to a tail of six histidines was cloned in *Escherichia coli* TOP10 and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. The conditions for induction of the recombinant protein were 0.5 mM IPTG, 16 hours, TB medium ethanol 3% (v / v), 28 °C, OD₆₀₀: 1-1.5 and 200 r.p.m. The purification was carried out under denaturing conditions with Ni-IDA resin (His60 Ni Superflow) on a small scale and 2.6 µg of partially purified recombinant LptD was obtained for each 1 mL of induced bacterial culture (OD₆₀₀: 1-1.5). The positive result of the Western Blot assay showed the antigenicity of the recombinant LptD protein against sera from patients suffering from Carrion's disease. In conclusion, the recombinant LptD protein shows antigenicity both *in silico* and serologically, these results are the basis for further studies of the LptD protein in the line of research of vaccine candidates against Carrion disease.

Key words: Carrion disease, LptD protein, *Bartonella bacilliformis*, recombinant protein, antigenicity.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Carrión (EC) es una de las enfermedades desatendidas metaxénicas presente en los valles interandinos de América del Sur (Perú, Colombia y Ecuador), la cual, ha sido poco investigada y en la actualidad no cuenta con un programa eficiente de prevención. *Bartonella bacilliformis* es el agente etiológico de la EC y el vector es el mosquito hembra del género *Lutzomyia*, siendo en Perú, *Lutzomyia verrucarum* la especie comúnmente reportada (Andre *et al.*, 1998).

El control de una enfermedad metaxénica se basa en estos dos pilares, control del vector a través de vigilancia entomológica; y en el tratamiento de las personas afectadas, cuyo éxito depende de un diagnóstico oportuno y adecuado, seguido de un tratamiento antimicrobiano, más la mejor forma de prevenir enfermedades desde el punto de vista de costo-beneficio son las vacunas, lamentablemente, la EC actualmente no cuenta aún con una vacuna (Pachas, 2000). Las metodologías para el desarrollo de vacunas han ido cambiando, contando actualmente con la vacunología reversa, ésta a diferencia de las técnicas tradicionales, permite el desarrollo de vacunas en menor tiempo y se apoya en varias ramas de la biología como la genómica comparativa, la proteómica, la transcriptómica la genómica estructural, biología de sistemas y la inmunogenómica (Seib *et al.*, 2012). En términos generales, la vacunología reversa consiste en realizar un análisis *in silico*, producir la proteína recombinante mediante ingeniería genética y realizar ensayos *in vitro* e *in vivo*, se sabe que *B. bacilliformis* no es fácil de cultivar en condiciones de laboratorio (Noguchi, 1926 citado por Pachas, 2001), ante ello la vacunología reversa se muestra como una buena alternativa de producción de una vacuna a base de proteínas recombinantes.

Las investigaciones en relación a la EC se han direccionado a la búsqueda de proteínas antigénicas que puedan ser usadas en pruebas de diagnóstico y muy pocas

en búsqueda de candidatos vacunales, así tenemos la identificación de 3 proteínas de 31.5, 43 y 45 kDa que presentaban pronunciada precipitación al ser expuestas a suero de conejo inmunizados (Minnick *et al.*, 1994), la identificación de 6 proteínas que interaccionan con eritrocitos (Iwaki-Egawa *et al.*, 1997), la reducción de la asociación de los eritrocitos con *B. bacilliformis* preincubadas con antisuero de flagelina (Benson *et al.*, 1986; Battisti *et al.*, 1999), la alta sensibilidad y especificidad de la lipoproteína recombinante rBbLppB, Pap 31 y subunidad α sintetasasuccinil-CoA (SCS- α) y la subunidad β sintetasasuccinil-CoA (SCS- β) como prueba de diagnóstico (Angkasekwina *et al.*, 2004; Gomes, 2016), las proteínas autotransportadoras de adhesión del género *Bartonella* que poseen importancia como candidatas vacunales (Riess *et al.*, 2004), la identificación de la proteína de invasión asociada al locus B (IalB) que favorece la invasión a los eritrocitos (Henríquez-Camacho *et al.*, 2015), entre otras.

El desarrollo de una vacuna consta de una fase de investigación básica y otra aplicada. La primera es fundamental y da soporte para la segunda fase. La presente investigación tiene como objetivo evaluar *in silico* y serológicamente el potencial antigénico del dominio extracelular recombinante de la proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos - D (LptD) de *Bartonella bacilliformis*, los resultados obtenidos serán de importancia en la línea de investigación básica del desarrollo de una vacuna contra la enfermedad de Carrión.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedad de Carrión

La enfermedad de Carrión es una enfermedad endémica de valles interandinos de los Andes de América del Sur (Perú, Colombia y Ecuador), siendo considerado el Perú la zona endémica más importante del mundo (Henriquez-Camacho *et al.*, 2015). Según los estudios realizados por el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA (2019) entre los departamentos mayormente afectados tenemos a Ancash, Cajamarca, Amazonas, Cusco, Huánuco, La Libertad, Ayacucho, Lima, en el año 2017 se notificó 270 casos; y en el 2018, 172 casos. La cantidad de casos de EC es fluctuante año tras año, el desencadenamiento de esta enfermedad al igual que de otras enfermedades metaxénicas están vinculadas a los cambios climáticos, la pluviosidad, el movimiento migratorio, la temperatura, la especie vectorial predominante, las cepas circulantes, siembra y cultivos, siendo en estos últimos 5 años la EC la enfermedad metaxénica con mayor índice de letalidad y mortalidad (MINSA, 2019), además en las dos últimas décadas las áreas endémicas vienen expandiéndose (Minnick, 2014).

La EC se presume que ha estado presente desde las culturas precolombinas (Mochica, Chimú y cultura Jama Coaque) por las representaciones de lesiones verrucosas en huacos de cerámica antropomórficos. También se sabe de una epidemia que azotó en el periodo inca durante el mandato de Huayna Cápac, donde se menciona que existió más de 200 000 personas fallecidas, y por los síntomas descritos es muy probable que se tratara de la EC, en 1531 Pedro Pizarro menciona la presencia de una epidemia que afectó a los primeros colonizadores, ellos mostraron como uno de los síntomas más evidentes a las verrugas sangrantes, pero no es sino

hasta 1632, cuando el médico Gago de Vadillo redacta el primer reporte de esta enfermedad en la localidad de Huaylas, departamento de Ancash. La construcción del ferrocarril de la Oroya (1870) es considerado un hito en la historia de la EC por la magnitud de personas afectadas, alrededor de 7000 obreros de un total de 10000 fueron las víctimas de la EC, que por ese entonces se denominó Fiebre de la Oroya (Schultz, 1968; Cueto, 1996 citado por Pachas, 2005). En estas circunstancias, y ante los debates académicos sobre si la Fiebre de la Oroya era una nueva enfermedad o si se trataba de la misma enfermedad de la Verruga Peruana, Daniel Alcides Carrión, realiza su heroico estudio con el cual se reafirma que se trataba de la misma enfermedad (Pachas, 2001).

La EC por mucho tiempo se consideró que presentaba 2 fases definidas, sin embargo actualmente se observa una gama sintomatológica más compleja, se postula la existencia de 3 formas clínicas: aguda anemizante, crónica verrucosa y bacteriemia asintomática, las cuales no siguen necesariamente el orden mostrado, igualmente, no se presentan todas las formas en un mismo paciente. La forma aguda anemizante es la más grave, se presenta con una serie de síntomas, cefalea, náuseas, fiebre, dolor muscular, vértigo, entre otras, las cuales pueden verse agravadas si el paciente padece otras enfermedades, como, anemia crónica, desnutrición, diabetes, parasitosis, alcoholismo; el progreso de la enfermedad suele ser impredecible, incluso luego de iniciado el tratamiento se puede desencadenar el síndrome séptico generando la muerte (MINSA, 2006). La forma verrucosa puede o no presentarse luego de la forma aguda, la aparición de verrugas puede ser de diferentes formas miliar, nodular y mular. En esta etapa se debe continuar con la medicación sino se corre el riesgo que la persona se convierta en una reserva asintomática de la *Bartonella bacilliformis*. Por último, la forma bacteriemia asintomática puede darse en

pacientes que se han recuperado de las anteriores fases, o puede darse en personas que nunca mostraron sintomatología, se sugiere que dichas personas se convierten en reservorios de la enfermedad (MINSA, 2006).

2.2. *Bartonella bacilliformis*

Bartonella bacilliformis considerado el agente etiológico de la enfermedad de Carrión es un bacilo gramnegativo, el cual crece lentamente en medios enriquecidos con sangre y aminoácidos esenciales, siendo su temperatura óptima de crecimiento es 28 °C. Es una bacteria intracelular de las células endoteliales y eritrocitos (Noguchi y Battistini, 1926; Solano M y Solano L, 1991).

Las diversas especies del género *Bartonella* son patogénicas y poseen distintos reservorios, más en el caso de *Bartonella bacilliformis* presenta como único reservorio al hombre y como vector a los mosquitos hembra del género *Lutzomyia*. En zonas endémicas es común la existencia de personas con enfermedad crónica o personas infectadas asintomáticas, las cuales, son el reservorio latente de este patógeno (Kosck *et al.*, 2000; Chamberlin *et al.*, 2002 citados por Chaloner *et al.*, 2011).

En Perú los principales vectores implicados en la transmisión de *B. bacilliformis* son *Lutzomyia verrucarum* y *Lutzomyia peruensis*, otros potenciales vectores son *Lutzomyia serrana* en el valle del Monzón; Huánuco, *Lutzomyia pescei* en Apurímac y Cusco; *Lutzomyia robusta* y *Lutzomyia maranonensis* en provincias de la selva alta (Zorrilla *et al.*, 2017).

A nivel taxonómico se clasifica (NCBI: txid360095):

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Bartonellaceae

Género: *Bartonella*

Especie: *Bartonella bacilliformis*

2.3. Antigenicidad de *Bartonella bacilliformis*

Actualmente, no se cuenta con una vacuna contra esta enfermedad, mas existen investigaciones en relación a la búsqueda de proteínas que muestren antigenicidad. Las proteínas que son de interés en el momento de la búsqueda de candidatos vacunales son las proteínas de membrana externa, como las porinas, lipopolisacáridos y adhesinas, los cuales presentan una elevada antigenicidad, probablemente por exponer los epítopes hacia la matriz extracelular conllevando a la interacción con el sistema inmunológico del huésped (Mao, 2007). Minnick (1994) identificó 14 proteínas de membrana externa de *Bartonella bacilliformis* de pesos moleculares entre 11.2 a 75.3kDa, de las cuales, 3 de ellas (31.5, 43 y 45 kDa) evidenciaron mayor potencial antigénico en pruebas de laboratorio. Uno de los primeros eventos que se desarrolla en la enfermedad de Carrion, es la invasión de los eritrocitos por parte de *B. bacilliformis*, lo cual, termina generando cuadros de anemia. Se ha identificado 6 proteínas que median la interacción con los eritrocitos, cuyos pesos moleculares son 100, 92, 84, 46, 37 y 12 kDa (Iwaki-Egawa *et al.*, 1997). Otro factor que favorece la invasión es el movimiento flagelar de *B. bacilliformis*, en forma de tirabuzón. El antisuero de flagelo reduce en gran medida la asociación entre *B. bacilliformis* y los eritrocitos (Scherer *et al.*, 1993), además, se evidencia poca adherencia a los eritrocitos por parte de las variantes inmóviles de *B. bacilliformis* y los mutantes que no poseían flagelo (Benson *et al.*, 1986; Battisti *et al.*, 1999). De dichos trabajos se presume que la flagelina resulta ser un antígeno prometedor para ser utilizada como una proteína vacunal o ser usada en pruebas serológicas de diagnóstico. Mas, en trabajos posteriores se obtiene resultados que muestran reactividad cruzada del suero proveniente de la exposición a la proteína flagelina de *B. bacilliformis* con los de Salmonelosis y Brucelosis. Ello se debe a la alta similaridad entre las proteínas

flagelinas de especies filogenéticamente cercanas a *B. bacilliformis*. En consecuencia, la proteína flagelina presenta epítopes con baja especificidad, además el hombre posee una microbiota intestinal de los cuales un porcentaje de microorganismos poseen flagelos, así que una vacuna a partir de flagelina podría ser contraproducente (Gallegos *et al.*, 2005). Caso contrario sucede con la lipoproteína recombinante rBbLppB que muestra una alta sensibilidad y especificidad como prueba de diagnóstico (Padilla *et al.*, 2006). Ese trabajo apunta a la búsqueda de una prueba rápida de diagnóstico pero a la vez nos muestra el potencial antigénico de la lipoproteína recombinante rBbLppB. De igual forma la proteína Pap31 en pruebas de diagnóstico permite discriminar entre individuos infectados y no infectados teniendo como ventaja el bajo costo y el alto rendimiento (Angkasekwinai *et al.*, 2004).

Las proteínas autotransportadoras triméricas de adhesión de *Bartonella* (TAAs), son un grupo de proteínas de importancia como candidatos vacunales, ellas están involucradas en el proceso de invasión a sus células hospederas llevado a cabo por las diferentes especies del género *Bartonella*, las cuales invaden una variedad de células eucariotas (Riess *et al.*, 2004). *B. bacilliformis* posee tres genes candidatos para la expresión de proteínas repetidas (Brps) (Kaiser *et al.*, 2011). Existe una similitud estructural y dominios compartidos entre los TAAs y Brps. En *B. henselae* y *B. quintana*, las proteínas TAAs presentan reacciones de autoaglutinación, adhesión a células hospederas y a la matriz extracelular, inhibición de fagocitosis e inducción de una respuesta proangiogénica en células hospederas (Minnick *et al.*, 2014). De lo anterior, se puede inferir que las proteínas Brps tienen potencial de originar reacciones inmunológicas similares a las TAAs.

La proteína de invasión asociada al locus B (*ialB*) de *B. bacilliformis* favorece significativamente el proceso de invasión hacia los eritrocitos (Coleman *et al.*, 2003).

Las proteínas *ialB* se encuentran ubicadas en la membrana interna (Henríquez-Camacho *et al.*, 2015). Dicha ubicación representa una desventaja para ser utilizada como candidato vacunal, debido a que, dificultaría la interacción con células del sistema inmunológico. Otra proteína ubicada en la membrana interna es, la FtsZBb de *B. bacilliformis*, esta proteína presenta homología estructural con la proteína de división celular de *B. henselae* y propicia una respuesta inmunogénica fuerte (Knobloch, 1988; Padmalayam *et al.*, 1997; Henriquez-Camacho *et al.*, 2015), sin embargo, por su ubicación no sería la indicada a ser utilizada como proteína vacunal. Gomes (2016) menciona que la subunidad α de succinil-CoA sintetasa (SCS- α) y la subunidad β de succinil-CoA sintetasa (SCS- β) son antígenos que podrían ser utilizados como una herramienta de diagnóstico rápido para la enfermedad de Carrión. Estos antígenos muestran una alta especificidad en las pruebas de ELISA, siendo capaz de detectar la presencia de *B. bacilliformis* en las personas expuestas al patógeno y en las portadoras asintomáticas de la enfermedad de Carrión. Dichas proteínas, se muestran como buenos antígenos para ser utilizados en pruebas de diagnóstico pero no para vacunas, debido a que son enzimas que se encuentran en la matriz citoplasmática, y ello desfavorece la interacción con las células del sistema inmunológico del hospedador.

2.4. Vacunología reversa

Levine y Lagos (1990), mencionan que las vacunas son consideradas la mejor forma, desde el punto de vista de costo-beneficio, de prevenir enfermedades y salvar vidas. Por otro lado, Ferreira y Porco (2008), menciona que “el desarrollo de las vacunas ha sido una de las contribuciones más relevantes del campo de la inmunología a la medicina en el Siglo XX, ya que ha permitido la erradicación de enfermedades infecciosas tan devastadoras como la viruela.”

La forma de obtención de las vacunas ha ido cambiando, desde las vacunas de primera generación cuya elaboración fue en base al agente infeccioso muerto o atenuado, o utilizando algún componente purificado del mismo. Luego, estuvieron las vacunas de segunda generación en base a componentes antigénicos altamente purificados del agente infeccioso (Del Giudice y Rappuoli, 1999; Wack y Rappuoli, 2005). La desventaja de dichas formas de obtener una vacuna reside en que están basados en el cultivo de los microorganismos, lo cual es un gran obstáculo en el momento de realizar vacunas de aquellos microorganismos no cultivables o de difícil cultivo (Rappuoli, 2000, 2001a; Massignani *et al.*, 2002). Dicha desventaja fue superada con la vacunología reversa, la cual se apoya de varias ramas de la biología como de la genómica comparativa, la proteómica, la transcriptómica, la genómica estructural, biología de sistemas y la inmunogenómica (Seib *et al.*, 2012). La vacunología reversa convierte el diseño de vacunas en un proceso rápido y más factible, debido a que, el análisis *in silico* permite ahorrar el tiempo de las pruebas de ensayo y error comunes en las técnicas convencionales (Rappuoli, 2001b).

Así mismo, el contar con las secuencias genómicas de un microorganismo nos permite descubrir nuevos antígenos que no habían podido ser encontrados mediante las técnicas convencionales (Rappuoli, 2000).

Esta metodología fue empleada con éxito por primera vez con el patógeno *Neisseria meningitidis* serogrupo B realizándose una vacuna contra la meningitis meningocócica y en noviembre del 2012 la Agencia de Medicina Europea recomienda y autoriza su comercialización (Delany *et al.*, 2013). También ha sido aplicada a otros patógenos como la *Streptococcus pneumoniae* (Wizemann *et al.*, 2001), *Staphylococcus aureus* (Etz *et al.*, 2002), *Bacillus anthracis* (Ariel *et al.*, 2002), *Chlamidia pneumoniae* (Capo *et al.*, 2005), *Porphyromonas gingivalis* (Ross *et al.*, 2001), incluyendo organismos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (Betts, 2002) y al protozoario

Plasmodium falciparum (Long y Hoffman, 2002), entre otras, y ha proporcionado nuevos antígenos candidatos para la investigación preclínica y clínica.

2.5. Sistema pET-28a (+)

Los sistemas pET son unos de los más eficientes sistemas desarrollados para el clonamiento y expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Estos sistemas están bajo el control en el promotor T7 cuenta con 35 tipos de vectores, 11 diferentes cepas huésped de *E. coli* y muchos otros productos complementarios para una mejor expresión de la proteína diana.

Los plásmidos o vectores pET-28a-c (+) llevan una etiqueta His • Tag / trombin / T7 • N-terminal y una etiqueta opcional llamada His • Tag C-terminal. En la **Figura 1** se representa en un mapa circular al plásmido pET-28a(+) con la ubicación de sus principales regiones. Este plásmido mide 5 369 bp y muestra resistencia al antibiótico Kanamicina. (Novagen, 2011).

2.6. Sistema de clonamiento *E. coli* TOP10

El sistema de clonamiento *E. coli* TOP10 es eficaz para la clonación y propagación de plásmidos, permiten una replicación estable, así como la existencia de una gran cantidad de copias por huésped. *E. coli* TOP10 muestran las siguientes características:

- hsdR para una transformación eficiente del ADN no metilado de amplificaciones de PCR.
- mcrA para una transformación eficiente del ADN metilado de preparaciones genómicas.
- lacZΔM15 permite la coloración azul / blanco de clones recombinantes.

- endA1 para mejores resultados debido a la eliminación de reacción inespecifica por endonucleasa I.
- recA1 para la reducción de procesos de recombinación inespecifica del ADN clonado.

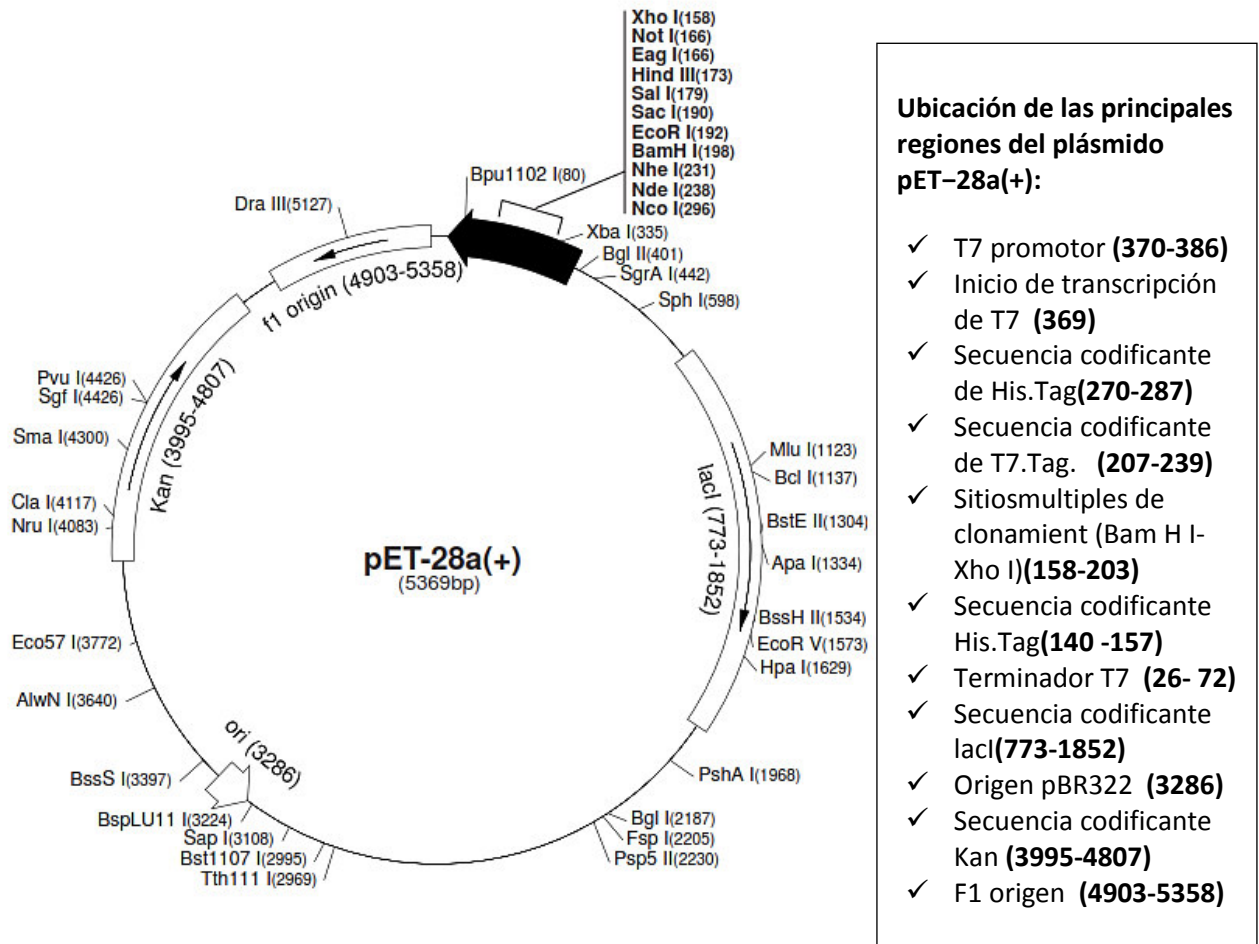


FIGURA 1. Mapa circular del Plásmido pET-28a(+)

Genotipo: F- mcrA Δ (mrr-hsd RMS- mcr BC) la80 lacZ Δ M15 Δ lac X74 rec A1 ara D139 Δ (araleu) 7697 gal U gal K rps L (StrR) end A1 nup G.

El sistema pET es compatible con *E. coli* TOP10. (Invitrogen, Información del producto: One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*).

2.7. Sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

El sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) pLysS es compatible con el sistema pET. Esta cepa posee como principal característica contener al plásmido pLysS el cual codifica la lisozima T7.

Los vectores pET poseen un gen lac I que codifica al represor Lac I, cuya ubicación es justo después de la secuencia de ADN correspondiente al promotor T7.

Para la expresión del gen de interés se usa al promotor T7 que solo interacciona con la ARN polimerasa del bacteriófago T7. La ARN polimerasa de *E. coli* no puede reconocer al promotor T7. El represor lac (LacI) se une de una manera específica a la secuencia operadora y bloquea la ARN polimerasa T7 para que no se una a la secuencia promotora.

Por ello, antes de que se transcriba el gen de interés, acontecen dos sucesos:

- ✓ El represor lac (LacI) debe retirarse de la secuencia de ADN del operador.
- ✓ La ARN polimerasa T7 debe introducirse y reconocer el promotor T7 en ausencia de represor.

Luego de ello, la transcripción del gen de interés procederá rápidamente. En la mayoría de casos se debe realizar la inducción durante la fase de crecimiento de *E. coli* (DO 600nm entre 0.6 y 0.8) para obtener un rendimiento máximo de la expresión del gen. (Novagen, Información del producto: Manual del Sistema pET).

2.8. Mecanismo de inducción por IPTG

El gen que codifica la ARN polimerasa de T7 ha sido diseñado en muchas cepas de *E. coli* bajo un sistema de operación lac modificado, a esta cepa de *E. coli* se la conoce

E. coli BL21 (DE3). Tan pronto como la proteína represora lac (LacI) es retirada de la secuencia de operador lac del ADN del cromosoma del huésped, se transcribirá y traducirá la ARN polimerasa T7. En el caso de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS posee un gen adicional que codifica la lisozima T7 que inactiva a la ARN polimerasa T7. Esto evita la expresión basal de la proteína antes de la inducción.

La proteína represora lac (LacI) detecta la presencia de lactosa. Tanto el cromosoma huésped como el inserto tienen copias del gen represor lac para garantizar que siempre haya suficiente proteína LacI para bloquear todos los sitios del lac promotor y del promotor T7. Cuando la lactosa se une a LacI, induce un cambio conformacional en la estructura de la proteína que la hace incapaz de unirse a la secuencia de ADN del operador. El IPTG es un imitador estructural de la lactosa (se asemeja al azúcar de la galactosa) que también se une al represor lac e induce un cambio conformacional que reduce en gran medida su afinidad por el ADN (Daber *et al.*, 2007).

A diferencia de la lactosa, la IPTG no forma parte de ninguna vía metabólica y, por lo tanto, no se degrada ni es utilizado por la célula. Esto asegura que la concentración de IPTG añadida permanezca constante.

Una vez que el represor lac ya no puede unirse al operador, la ARN polimerasa de *E. coli* nativa comienza a transcribir, en grandes cantidades, el gen de la ARN polimerasa T7 diseñado en su cromosoma. Una vez que se expresa la proteína T7 ARN polimerasa, se une a la secuencia del promotor T7 corriente arriba de su gen de interés en la inserción del plásmido y transcribe su gen diana. Por lo general, dentro de una o dos horas, la proteína de interés será la más abundante dentro de la célula. (Novagen, Manual del Sistema pET). La representación gráfica del proceso se visualiza en la **Figura 2**.

The pET vector system for protein production.

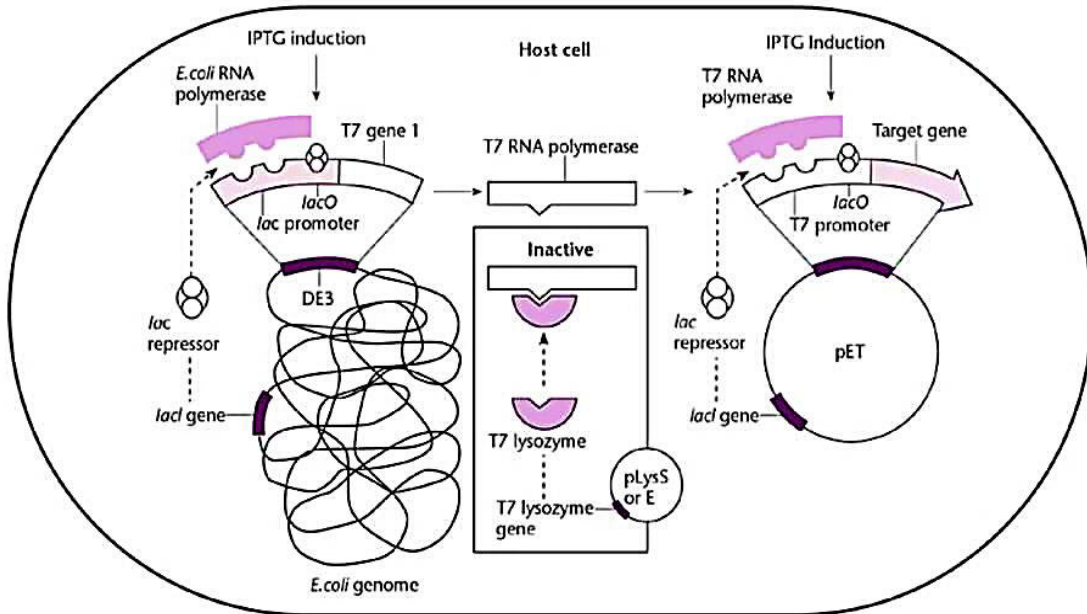


FIGURA 2. Sistema de Expresión en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mediada por la inducción con IPTG (Novagen, Manual del Sistema pET).

2.9. Purificación de proteínas por cola de histidina

La purificación de proteínas recombinantes etiquetadas con residuos de polihistidina mediante resina cargadas con níquel se utiliza con éxito en varios sistemas de expresión, como en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, células de mamíferos y células de insecto infectadas con baculovirus (Bornhorst y Falke, 2000). Los dos quelantes más comunes utilizados son el ácido iminodiacético (níquel-IDA o Ni-IDA) y el ácido nitrilotriacético (níquel-NTA o Ni-NTA). Los iones metálicos poseen cuatro sitios de coordinación, dos sitios interactúan con la resina y dos están libres para interactuar con los residuos de histidina de las proteínas etiquetadas (**Figura 3**).

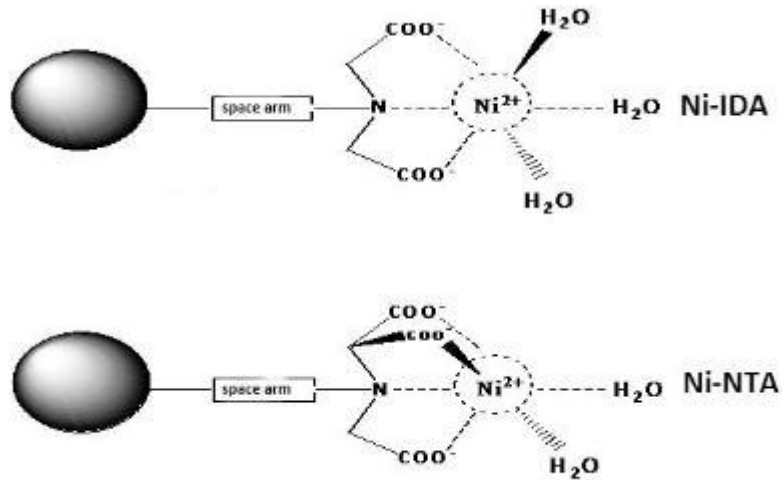


FIGURA 3. Resina níquel-NTA y Ni-NTA. (Fuente: /www.abbkine.com/exclusive-ni-super-resin-product-for-his-tag-protein-purification-released/)

La resina His60 Ni Superflow (Clontech) es una resina Ni-IDA de alta capacidad (60 mg / mL) en comparación con la resina Ni-NTA cuya capacidad oscila entre 5-10 mg/ mL (Bornhorst y Falke, 2000), otras características favorables son su alta pureza y la baja fuga de iones níquel en su estructura.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

“El dominio extracelular de la proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos - D (LptD) de *Bartonella bacilliformis* es antigénica”.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Evaluar *in silico* y serológicamente el potencial antigénico del dominio extracelular recombinante de la proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos - D (LptD) de *Bartonella bacilliformis*.

3.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar *in silico* el potencial antigénico del dominio extracelular de la proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos - D (LptD) de *B. bacilliformis*.
- Obtener de manera recombinante el dominio extracelular de la proteína LptD de *B. bacilliformis* en *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS.
- Expresar y purificar por cola de histidina a pequeña escala el dominio extracelular de la proteína recombinante LptD.
- Evaluar la antigenicidad del dominio extracelular de la proteína recombinante LptD por medio de Western Blot.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Análisis bioinformático

4.1.1. Selección del genoma y proteoma de *Bartonella bacilliformis*.

La búsqueda del genoma y del proteoma de *B. bacilliformis* se realizó en la base de datos del Genbank (Benson *et al.*, 2013), del cual se escogió el genoma de *Bartonella bacilliformis* KC583 por estar completamente ensamblado y poseer solo un contig (ID Assembly: GCA_000015445.1). *Bartonella bacilliformis* KC583 cuenta con un total de 1 444 107 pb con un contenido medio de G + C de 38,3% y 1 244 secuencias codificantes predichas (Tarazona, *et al.*, 2013). Posteriormente, se procedió a descargar el archivo fasta del proteoma de *Bartonella bacilliformis* KC583.

4.1.2. Selección de la proteína LptD de *Bartonella bacilliformis*

Los lineamientos de la vacunología reversa fueron utilizados para la identificación y selección de la proteína en estudio. El primer objetivo fue seleccionar una proteína de membrana externa, para ello, se utilizó el programa SignalP4.1 (Petersen *et al.*, 2011), el cual, evaluó la presencia del péptido señal en la secuencia aminoacídica de las proteínas del proteoma de *B. bacilliformis*.

El potencial antigénico de las proteínas se determinó con el servidor VaxiJen v2.0, se escogieron a las proteínas que tuvieran una alta probabilidad de ser antigénicas, siendo el umbral de 0.5 como lo describe Doytchinova y Flower, 2007. El siguiente filtro se realizó con el servidor Vaxign (He *et al.*, 2010) el cual, realiza la ubicación de la proteína, existiendo 6 posibilidades: región extracelular, membrana externa, periplasma, membrana citoplasmática, citoplasma o ubicación desconocida. Se seleccionó las proteínas de membrana externa debido a que los epítomos al estar expuestos en la superficie celular

pueden ser reconocidos fácilmente por el sistema inmune del huésped (Li *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). El programa Vaxign también permite identificar si la proteína tiene similitud con proteínas humanas, de ratón o de cerdo, así como la longitud de la proteína y su probabilidad de ser adhesinas (He *et al.*, 2010). La longitud de la proteína para ser inmunogénico debe ser mayor de 10 kDa (López-Hoyos, M., 2004), por ello se seleccionó proteínas de mayor tamaño.

Los criterios que se tomaron en cuenta para ser considerado una proteína con potencial antigénico a nivel *in silico* fueron:

- Alta probabilidad de ser antígeno, siendo los valores > 0.5 (Programa VaxiJen v2.0).
- Localización en la membrana externa con probabilidad lo más cercana a 1 o igual a 1 (Programa Vaxign).
- No presentar similitud con proteínas humanas, de ratón, o de cerdo (Programa Vaxign).
- Longitud de la proteína debe ser mayor a 10 kDa (Programa Vaxign).
- No ser una proteína utilizada en otro estudio y/o que esté patentada.

4.1.3. Caracterización y modelización proteica

Las propiedades fisicoquímicas de la proteína se evaluó con el servidor ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005), dicho programa hace uso de la secuencia aminoacídica para realizar su análisis, como resultado obtenemos el peso molecular, el punto isoeléctrico teórico, composición aminoacídica, composición atómica, vida media, índice alifático, promedio de hidrofobicidad e índice de inestabilidad de la proteína.

Para el modelamiento de la proteína se utilizó el programa Raptor X Structure Prediction (Källberg *et al.*, 2012), este programa realiza la predicción de la estructura proteica en base a la secuencia de aminoácidos de la proteína problema, nos aporta resultados sobre la estructura secundaria de la proteína, regiones desordenadas, accesibilidad a solventes, entre otras. Para la validación del modelo se realizó con el plot de Ramachandran, a través del programa Rampage: Ramachandran Plot Assessment (Lovell *et al.*, 2003). Finalmente se realizó la ubicación espacial de la proteína con el programa PPM server (Lomize *et al.*, 2012) este programa calcula las posiciones de rotación y traslación de las proteínas transmembrana y periféricas en base a su estructura 3D (archivo de coordenadas PDB).

4.1.4. Identificación de epítopes

El siguiente paso fue la búsqueda de epítopes, para ello se hizo uso del programa Ellipro (Ponomarenko *et al.*, 2008), se realizó la búsqueda de epítopes lineales y discontinuos de la proteína en estudio, así mismo, nos permitió visualizar la ubicación del epítope en un modelo tridimensional. Dentro de los parámetros utilizados fue el índice de protusión (IP), el cual nos permite medir qué porcentaje de la zona evaluada pertenece a un epítope, por ejemplo un $IP = 0.9$ hace referencia que el 90% de la zona evaluada corresponde a los residuos de un epítope. El punto de corte considerado para la selección de epítopes fue valores mayores a 0.5 (Índice de protrusión $(IP) > 0.5$) y con una máxima distancia abarcada por los epítopes discontinuos de 6 Angstroms.

4.1.5. Evaluación de la toxicidad proteica

El servidor Toxin Pred – Protein Scanning (Gupta *et al.*, 2013) genera de forma superpuesta todos los posibles péptidos y sus análogos mutantes de la proteína analizada y predice si el péptido/análogo superpuesto es tóxico o no, toma como referencia a la

base de datos de Swiss-Prot, realiza análisis de composición de aminoácidos, composición de dipéptidos, análisis de motivos, entre otras.

4.1.6. Selección de péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II

La predicción de la unión entre péptidos de la proteína con el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I y II se realizó con el programa NetMHCpan 4.0 Server y NetMHCII 2.3 Server (Jurtz *et al.*, 2017; Jensen *et al.*, 2018). Se obtuvo con ello los péptidos que presentaban unión fuerte con los HLA-I y HLA-II. La medida de selección de péptidos de unión fuerte se define por el % de afinidad <0.5 , y los péptidos de unión débiles con % de afinidad <2 pero por encima de 0.5 .

4.1.7. Cobertura de protección poblacional de los péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II

El servidor IEDB (Bui *et al.*, 2006) evaluó el porcentaje de cobertura de la interacción de los HLA-I y HLA-II más frecuentes de la población peruana con los péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II. El porcentaje de cobertura de protección evaluado fue a nivel Nacional, Sudamericano y Mundial. En la **Tabla 1** se muestra los HLA-I y HLA-II más frecuentes y más importantes en la población peruana (datos obtenidos por comunicación personal del Dr. Adolfo Marcelo –Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Histocompatibilidad.).

TABLA 1. HLA-I y HLA-II más frecuentes en la población peruana

Predicción de unión a HLA-I-9aa		Predicción de unión a HLA-II-11aa	
HLA más frecuentes	HLA menos frecuentes pero importantes	HLA más frecuentes	HLA menos frecuentes pero importantes
HLA-A*02:01 HLA-A*23:01 HLA-A*24:02 HLA-A*31:01 HLA-A*68:01	HLA-A*01:01 HLA-A*03:01 HLA-A*26:01 HLA-A*30:01 HLA-A*33:01	HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*08:01 HLA-DRB1*09:01 HLA-DRB1*13:01	HLA-DRB1*01:01 HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB1*07:01 HLA-DRB1*11:01 HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*16:02
HLA-B*07:02 HLA-B*15:01 HLA-B*35:01 HLA-B*39:01 HLA-B*40:01 HLA-B*44:02 HLA-B*48:01 HLA-B*51:01	HLA-B*08:01 HLA-B*14:01 HLA-B*18:01 HLA-B*27:01 HLA-B*38:01 HLA-B*49:01 HLA-B*52:01		

Fuente: Comunicación personal del Dr. Adolfo Marcelo –Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Histocompatibilidad.

4.2. Elaboración de primers

Los primers para la amplificación y clonación fueron diseñados utilizando los programas PrimerSelect 4.05 (ADNSTAR Inc. Madison, USA) y OligoAnalyzer 3.1 de IDTADN. Los primers fueron modificados para incluir los sitios de cortes para enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* respectivamente (**Tabla 2**).

En el caso del *forward* se añade el sitio de restricción para la enzima *NcoI* (C/CATGG); y para el *reverse* se añade, *XhoI* (C/TCGAG). A los primers se les añade la cola T para agregar los sitios de restricción a los productos del PCR. El tamaño del amplicón clonado orf fue de 1 756 pb (**ANEXO B.3**).

TABLA 2. Secuencia de primers para la amplificación de la secuencia génica del dominio extracelular de la proteína LptD

<i>Primer</i>	Secuencia 5´- 3´	Tamaño esperado del amplicón
<i>Forward</i>	TTTTTTCATGGTACCGGACCCAGCTGAAA	1 756 pb
<i>Reverse</i>	TTTTTCTCGAGTAAATTGAGTTTTATTTTTGACCGAAATCT	

4.3. Cultivo de *Bartonella bacilliformis*

El cultivo de *B. bacilliformis* cepa HBB4 de Huacabamba, Piura, Perú, se realizó en frascos con medio bifásico estéril, la composición del medio se coloca en la **Tabla 3**. Todo el proceso se llevó a cabo dentro de una cabina de flujo laminar vertical (Labconco) bajo condiciones de esterilidad y asepsia.

Se procedió a tomar un 1mL de un cultivo crecido de un frasco del cepario del Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud, y se lo coloca a un nuevo frasco con medio bifásico, luego se homogenizó mediante movimientos suaves, por último se procedió a colocarlo dentro de una estufa a 28 °C con una placa con algodón húmedo (Precision Scientific). El monitoreo del crecimiento se realizó semanalmente, obteniéndose un adecuado crecimiento luego de 3 - 4 semanas. El cultivo se realizó según la metodología de Ventura *et al.*, 2006.

TABLA 3. Composición del medio bifásico de cultivo

Fases del Medio Bifásico	Composición
Fase sólida	Agar Columbia 10% de sangre de carnero 0.1% de extracto de levadura
Fase líquida	RPMI suplementado con suero fetal bovino

4.4. Extracción y purificación de ADN genómico de *Bartonella bacilliformis*

La extracción de ADN genómico de *B. bacilliformis* se realizó con el Kit comercial Pure Link Genomic ADN (Invitrogen) dentro de una cabina de flujo laminar, utilizando material estéril y nuevo.

El primer paso fue cosechar cultivos frescos de *B. bacilliformis*, para ello, con un asa de siembra descartable, con aro de 1 μ L, se fue colectando las colonias y se colocaron en la fase líquida del medio de cultivo, luego se vertió todo el medio líquido en viales de 1.5 mL. A partir de 200 μ L del cultivo cosechado (OD₆₀₀: 0.6) se procedió a realizar la extracción de ADN genómico, la muestra fue centrifugado a 12 000 g por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Al *pellet* se le adicionó 180 μ L de buffer de lisis, y 20 μ L de proteinasa K, se homogeneizó por pipeteo, incubándose por 1 hora a 55 °C, y cada 20 minutos se homogenizó con un vórtex. Luego de la incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente 8 minutos. Posterior a ello, se procedió a adicionar 20 μ L de RNasa, se homogenizó las muestras por inmersión unas 10 veces y se incubaron por 5 minutos. Al lisado celular se le adicionó 180 μ L de buffer de unión y 180 μ L de etanol 96-100%, mezclándose usando el vórtex. La solución obtenida se colocó en una columna spin y se centrifugó la columna a 11 000 g por 1 minuto, se descartó el tubo colector y se pasó la columna a otro tubo colector. Se procedió a lavar la columna con 500 μ L del buffer de lavado, luego se centrifugó a 13000 g por 2 minutos, se retiró la columna con cuidado y se colocó en un tubo de 1.5 mL. La elusión se realizó con 50 μ L de buffer de elusión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido a ello, se centrifugó la columna a 13 000 g por 2 minutos. Finalmente, se guardó el ADN genómico purificado a - 20 °C hasta su posterior uso.

Para verificar la pureza e integridad del ADN genómico, la muestra de ADN fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 1%, corridas a 80 V por 1 h en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA).

4.5. Amplificación del gen *IptD*

La técnica de PCR utilizada se basó en la descrita por Delidow *et al.*, 1996, se utilizó del Kit AmpliTaq Gold™ ADN Polymerase con Gold Buffer y MgCl₂ (Applied Biosystems). Las concentraciones para el buffer Mix de PCR fueron las siguientes: MgCl₂ 25 mM, Buffer Gold 1X, *Primer forward* 10 mM, *Primer Reverse* 10 mM (**Tabla 2**), dNTPs 10mM y 1U de Taq Pol.

Se optimizó la temperatura de hibridación en la reacción de PCR, se evaluó 7 diferentes temperaturas: 51 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C y 62 °C. El resto de pasos en la reacción de PCR fueron:

Desnaturalización inicial:	95 °C por 10 minutos	
Desnaturalización:	96 °C por 30 segundos,	} 35 ciclos
Hibridación:	51 – 62 °C por 30 segundos,	
Amplificación:	72 °C por 2 minutos,	
Amplificación final:	72 °C por 10 minutos ,	
	4°C continuos	

Los productos de PCR se almacenaron a - 20 °C hasta su utilización. Por último, se realizó una corrida electroforética con los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% a 130 V por 40 minutos.

TABLA 4. Reactivos para la digestión del plásmido pET28a(+)

REACTIVOS	CANTIDAD (μL)
Plásmido o inserto	50
Buffer 10X (Promega)	7
Enzima de restricción <i>NcoI/XhoI</i> (Promega)	5
Agua de PCR	8

4.6. Clonamiento del gen *lptD*

El clonamiento del gen *LptD* en el plásmido pET28a(+) tuvo los siguientes pasos:

- Digestión con la enzima de restricción *NcoI* del plásmido pET28a(+) y del inserto *LptD*.
- Purificación de del plásmido pET28a(+) y del inserto *LptD* recién digeridos.
- Digestión con la enzima de restricción *XhoI* del plásmido pET28a(+) y del inserto *LptD*.
- Purificación del plásmido pET28a(+) y del inserto *LptD* recién digeridos.
- Ligación de pET28a(+) y del inserto *LptD*.

4.6.1. Digestión con enzima de restricción

La digestión tanto del plásmido pET28a(+) y del inserto *LptD* se realizó en la proporción de reactivos mencionada en la **Tabla 4**. La digestión se realizó en tubos de PCR y se dejó incubando a 37 °C por 16 horas.

4.6.2. Purificación del plásmido y del inserto

Luego de cada paso de digestión con las enzimas de restricción se realizó la purificación del digerido, para ello en un tubo de PCR se colocó 50 μL del plásmido o inserto digerido en 100 μL de Buffer 1X, luego se vertió dicha mezcla en la columna de purificación

TABLA 5. Reactivos para la reacción de ligación

REACTIVOS	CANTIDAD (μL)
Buffer de ligación 10X (Promega)	1
Plásmido pET28a(+) (Promega)	2.3
Inserto LptD	2
Agua de PCR	3.7
T4 ligasa (Promega)	1

TABLA 6. Reactivos para la reacción de autoligado

REACTIVOS	CANTIDAD (μL)
Buffer de ligación 10X(Promega)	1
Plásmido pET28a(+)	2.3
Inserto LptD	-----
Agua de PCR	5.7

(PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen), y se centrifugó a 12 000 g. La columna fue colocada en un nuevo tubo colector y se agregó 700 μL de buffer de lavado, y se centrifugó a 12 000 g. Por último, se pasó la columna a otro tubo colector y se añadió 50 μL de buffer de elusión, dejándolo 1 minuto en reposo para posteriormente centrifugar a 12 000 g. El producto purificado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.6.3. Ligación de pET28a(+) y del inserto LptD.

Por último, la ligación tanto del plásmido pET28a(+) con del inserto LptD en la proporción de reactivos mencionada en la **Tabla 5**.

También se realizó una reacción de autoligado con el fin de evaluar la probabilidad de ocurrencia de reacciones de autoligado de forma espontánea (**Tabla 6**).

Tanto la reacción de ligación y el autoligado se incubaron a 4 °C por 16 horas.

4.7. Células químicamente competentes

La obtención de células *E. coli* TOP10 y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS competentes se realizó siguiendo el protocolo de transformación de células químicamente competentes (B. D. Hanahan *et al.*, 1991). Se cultivó una colonia en 3 mL de caldo LB estéril a 37 °C con agitación por toda la noche, este cultivo constituyó el preinóculo. Al día siguiente en un frasco de 500 mL se colocó 100 mL de caldo LB estéril y se agregó 2 mL del preinóculo, incubándose con agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (OD) de 0.6 a 0.8 en el espectro a 600 nm. Luego se transfirió el cultivo en frascos de 50 mL y se enfriaron por 20 minutos a 4 °C. Posterior a ello, se centrifugó a 4 000 g por 10 minutos a 4°C; se eliminó el sobrenadante por decantación. El *pellet* se resuspendió cuidadosamente en 15 mL de 0.1 M CaCl₂ frío, luego se centrifugó a 4 000 g. por 15 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante, este paso se realizó dos veces. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 1 mL de glicerol al 30% frío (3 mL de glicerol puro en 7 mL de 1M CaCl₂). Se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

4.8. Transformación

La transformación de *E. coli* TOP 10 y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS se realizaron con los siguientes pasos:

A 50 µL de células químicamente competentes se le agregó 3 µL de plásmido purificado, incubándose por 30 minutos en hielo, luego se realizó un pulso de calor (42 °C por 90 segundos) usando un baño maría, seguido a ello, se coloca por 1 minuto en hielo y se añadió 950 µL de medio SOC estéril incubándose por 1 hora a 37 °C con agitación. El siguiente paso fue centrifugar a 900 g por 30 segundos, y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se siembra por extensión con un asa de Digalsky 50 µL en placas de LB agar

suplementado con kanamicina en una concentración final de 20 µg/mL. Las placas fueron incubadas en una estufa a 37 °C durante 16 horas.

4.9. Extracción y purificación de plásmidos

La extracción de plásmidos se realizó con el método de lisis alcalina modificado de Birnboim y Doly (1979) y Ish-Horowicz y Burke (1981), para ello se incubó 3 mL de caldo LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 20 µg/mL con una colonia de *E.coli* TOP10 – rLptD por toda la noche a 37 °C con agitación. Al siguiente día se centrifugó a 12 000 g por 2 minutos y se descartó el sobrenadante; el *pellet* se resuspendió con 100 µL de solución I fría (50 mM glucosa, 25 mM tris-HCl pH 8.0. 10 mM EDTA pH 8.0), 200 µL de solución II (0.1 M NaOH, 1% SDS) y 150 µL de solución III frío (3M potasio, 5 M de acetato), todo se realizó en una cubeta con hielo. Seguido a ello, se centrifugó a 12 000 g por 10 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Respecto a la purificación los plásmidos extraídos se realizaron con el Kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen), se añadió 1 mL de buffer de unión y se transfirió a una columna de purificación, seguido se añadió 650 µL de buffer de lavado a las columnas de purificación, se centrifugó a 13 000 g por 1 minuto y se eliminó el eluido. Luego, la columna de purificación se colocó en un tubo nuevo, donde se le añadió 50 µL de buffer de elusión centrifugándose a 13 000 g por 1 minuto. Además, se cuantificó 260 nm y determinó la pureza con la relación de A_{260}/A_{280} usando el espectrofotómetro (Thermo scientific). Finalmente, se realizó una electroforesis en agarosa al 1%, cargando una misma concentración de ADN en cada pocillo, con la finalidad de determinar la integridad de los plásmidos.

4.10. Secuenciamiento

El gen *lptD* de las clonas transformadas (*E. coli* BI21 (DE3) pLysS-*rLptD*) fue secuenciado según el método de Sanger et al (1977) y Murray (1989), para ello se utilizó como molde al gen *LptD* de *B. bacilliformis* KC583, los cuales fueron amplificados (según el apartado 4.4) y purificados con el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (AppliedBiosystems) (Miniprep, Invitrogen). En la **Tabla 7** se menciona la composición del mix de secuenciamiento por tubo.

El programa de PCR de secuenciamiento fue:

Desnaturalización inicial:	96 °C por 1 minuto	
Desnaturalización:	96°C por 10 segundos,	} 35 ciclos
Hibridación:	58 °C por 45 segundos,	
Polimerización:	60 °C por 60 segundos,	
Pausa:	4°C continuos	

TABLA 7. Reactivos para el mix de secuenciamiento

Reactivos	Para un tubo (µL)
Buffer 5X de secuenciamiento	2
Big Dye	2
Primer 2.5 µM	1
Molde :Producto de PCR purificado (5ng/µL)	5

Una vez culminado el ciclaje, se adicionó 50 µL de buffer de precipitación (acetato de sodio 3M, pH 5.4, EDTA 125 mM, etanol absoluto) a los pocillos de la placa, y se incubó a temperatura ambiente (18 - 25°C) por 15 minutos cubierto con papel aluminio. Luego se centrifugó la placa por 30 minutos a 2 000 g, se invirtió la placa sobre un papel toalla y se centrifugó por 10 segundos a 50 g. Se adicionó 90 µL de etanol al 70% a cada pocillo de

la placa; se centrifugó la placa por 30 minutos a 2000 g. Se invirtió la placa sobre un papel toalla y se centrifugó por 10 segundos a 50 g. Se secó a 72 °C por 3 minutos en el termociclador. Se añadió 10 µL de Hi-Di Formamida a los pocillos de la placa. Se denaturó en el termociclador por 2 minutos a 95°C y se colocó en hielo por 1 minuto. Finalmente se colocó en el secuenciador ABI y para el análisis del secuenciamiento se utilizó el programa Chromas Pro.

4.11. PCR Colonia

El PCR colonia se realizó con la finalidad de comprobar la existencia del gen *lptD* en los plásmidos pET28a(+)-*rLptD*, ello se realizó en las *E. coli* transformadas (*E. coli* TOP10-*rLptD* y *E. coli*BL21(DE3)*pLysS-rLptD*). Esta técnica consiste en colocar una minúscula cantidad de células de una colonia en el buffer Mix de PCR, este paso se realizó con la ayuda de un tip de 20 µL con la cual se toma una colonia. Luego se lleva a cabo la reacción de PCR y finalmente se realizó una corrida electroforética para analizar el ADN plasmídico (composición del buffer Mix de PCR, protocolo de PCR y electroforesis fue descrito en el apartado 4.4).

4.12. Preparación de medios de cultivos

Los medios de cultivo fueron preparados y esterilizados con autoclave por 20 minutos a 15 lb/s (**Tabla 8**).

Para la preparación de Agar LB suplementado con antibióticos se agregó kanamicina (concentración final de 20 µg/mL) y cloranfenicol (concentración final de 50 µg/mL) y 15 g de agar por litro de caldo LB.

TABLA 8. Composición de medios de cultivo

Medios Líquidos	Cantidad (L)	Composición
Caldo LB	1	10 g de Triptona 5 g de Extracto de levadura 10 g de NaCl
Caldo 2XYT	1	16 g de Triptona 10 g de Extracto de levadura 5 g de NaCl
Caldo TB	1	24 g de Extracto de levadura 12 g de Triptona 4 mL de Glicerol puro *Sales: 100 mL Fosfato de Potasio 1 mL Cloruro de Magnesio 4.5 mL Glucosa
Agar LB	1	10 g de Triptona 5 g de Extracto de Levadura 10 g de NaCl 15 g de Agar

*Las sales se esterilizan por filtración (filtro de 0.22 micras) y son agregados al momento de uso del caldo TB.

4.13. Criopreservación

Una vez comprobada la existencia del gen *lptD* en los plásmidos pET 28a(+)-*rLptD* de las *E. coli* transformadas (*E. coli*TOP10-*rLptD* y *E. coli*BL21(DE3)*pLysS-rLptD*) se procedió a criopreservarlas de la siguiente manera: se sembró una colonia transformada en un tubo con 3 mL de caldo LB suplementado con kanamicina, a una concentración final 20 µg/mL, toda la noche a 37 °C con agitación. Al siguiente día se agregó glicerol puro estéril al cultivo al 25% y se distribuyó en crioviales estériles, los cuales fueron almacenados a -80 °C. La criopreservación se realizó con el fin de contar con muestras genéticamente estables y viables incluso después de varios años (Pérez-Reytor y Sosa, 2010).

4.14. Inducción con IPTG

Los tubos de cultivo utilizados para el proceso de inducción fueron de 15 mL con 3 mL de caldo LB (para el preinóculo) o 3 mL de caldo TB (para la expresión) en ambos casos

fueron suplementado con kanamicina (concentración final de 20 µg/mL) y con cloranfenicol (concentración final de 50 µg/mL).

El pre-inóculo se preparó una noche antes del proceso de inducción para ello en un tubo de cultivo se colocó 10 µL de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-rLptD criopreservada y se incubó a 37 °C con agitación por 16 h. Al día siguiente se realiza el procedimiento de expresión, para ello se inocula en un tubo de cultivo 300 µL del preinóculo y se incuba en agitación a 37 °C hasta que alcance una absorbancia de 1 – 1.5 medido a un OD 600 nm. Luego se agregó el IPTG.

Para el proceso de optimización se evaluó 4 parámetros: concentración de IPTG, medios de cultivo, tiempo de inducción y concentración de etanol, en la **Tabla 9** se muestran con más detalle los rangos evaluados de los parámetros, así como las condiciones base de cada proceso realizado.

El cultivo obtenido se distribuyó en viales de 1.5 mL, en cada uno se colocó 1 mL de cultivo y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.15. Purificación de la proteína recombinante

Los pasos en este procedimiento fueron: 1. lisado del cultivo inducido, 2. cromatografía, 3. corrida electroforética.

4.15.1. Lisado del cultivo inducido

Se partió de 1 mL de cultivo, el cual, se centrifugó a 15 000 g por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante; se agregó al *pellet* 500 µL de PBS 1X pH 7.4 con el fin de lavarlo, se centrifugó a 15 000 g por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante.

TABLA 9. Parámetros de optimización

Parámetro a optimizar	Condiciones base	Condiciones a evaluar
Concentración de IPTG	Medio TB, OD ₆₀₀ : 1 – 1.5 Tiempo 16 h 200 r.p.m.	0 mM IPTG 0.05 mM IPTG 0.1 mM IPTG 0.25 mM IPTG 0.5 mM IPTG 1 mM IPTG 1.5 mM IPTG 2 mM IPTG
Medios de Cultivo	OD ₆₀₀ : 1 – 1.5 Tiempo 16 h 200 r.p.m. 0.5 mM IPTG	LB 2XYT TB
Tiempo de inducción	Medio TB OD ₆₀₀ :1– 1.5 200 r.p.m. 0.5 mM IPTG	4 h 7 h 16 h 24 h
Concentración de etanol	Medio TB OD ₆₀₀ :1 – 1.5 200 r.p.m. 0.5 mM IPTG Tiempo 16 h	1% de etanol 2% de etanol 3% de etanol

Posteriormente el *pellet* se lisó con 100 µL de buffer de lisis no denaturante, y se incubó en hielo por 30 minutos y se lisó las células por sonicación (Covaris: 10% ciclo de trabajo, 5 de intensidad acústica, 100 ciclos burst, 30 s, 0 – 10 °C). Luego se centrifugó a 15 000 g por 1 minuto, el sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su uso (sobrenadante I). Al *pellet* conseguido se dejó en buffer de lisis denaturante por 1 hora en hielo y se homogenizaba el lisado cada cierto tiempo, luego se centrifugó por 10 minutos a 15 000 g para eliminar los restos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo (sobrenadante II) (Figura 5).

4.15.2. Purificación por afinidad

Se realizó la purificación proteica en condiciones denaturantes y no denaturantes, los componentes de los buffers utilizados fueron según el manual de uso de la resina His60 Ni Superflow (Clontech) (**Tabla 10**).

A partir de los sobrenadantes (Sobrenadante I y II) obtenidos se añadieron 50 μ L de resina His60 Ni Superflow (Clontech) equilibrada (**Anexo A**), se incubó por 1.5 horas en frío bajo agitación constante. Los siguientes pasos de lavado y elución se realizaron con los buffers no denaturante o denaturante dependiendo de la muestra de origen. Para esto, se lavó la resina 2 veces con 250 μ L de buffer de lavado más 2.5 μ L de PMSF (100 mM) y se centrifugó por 10 segundos a 15 000 g entre lavado, se eliminó con cuidado el sobrenadante. Finalmente se eluyó la proteína con 25 μ L de buffer de elución más 0.25 μ L de PMSF, se almacenó el eluido a -20 °C hasta su uso (**Figura 6**).

TABLA 10. Buffers para la purificación con resina His60 Ni Superflow (Clontech)

BUFFER NO DENATURANTE (pH 7.4)	BUFFER DENATURANTE (pH.7.4)
Buffer de Lisis o Equilibrio: Fosfato de Sodio.....50 mM NaCl300 mM Imidazol20 mM	Buffer de Lisis o Equilibrio: Fosfato de Sodio.....50 mM NaCl300 mM Imidazol20 mM Úrea.....8 M
Buffer de Lavado: Fosfato de Sodio.....50 mM NaCl300 mM Imidazol40 mM	Buffer de Lavado: Fosfato de Sodio.....50 mM NaCl300 mM Imidazol40 mM Úrea.....8 M
Buffer de Elución: Fosfato de Sodio.....50 mM NaCl300 mM Imidazol300 mM	Buffer de Elución: Fosfato de Sodio.....50 mM NaCl300 mM Imidazol300 mM Úrea.....8 M

4.15.3. Cuantificación de proteínas por Bradford

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Así como primer paso se realizó una curva patrón a partir de una dilución 1 en 100 de BSA comercial (10 mg/mL) y a partir de ella fueron obtenidas las concentraciones desde 1.25 µg/mL hasta 80 µg/mL (**Figura 4**). Se utilizó la dilución de 1 en 30 de cada eluido (volumen final 150 µL) y se agregó 150 µL de reactivo de Bradford. Luego de 15 minutos fue cuantificada la reacción en un espectrofotómetro a 595 nm.

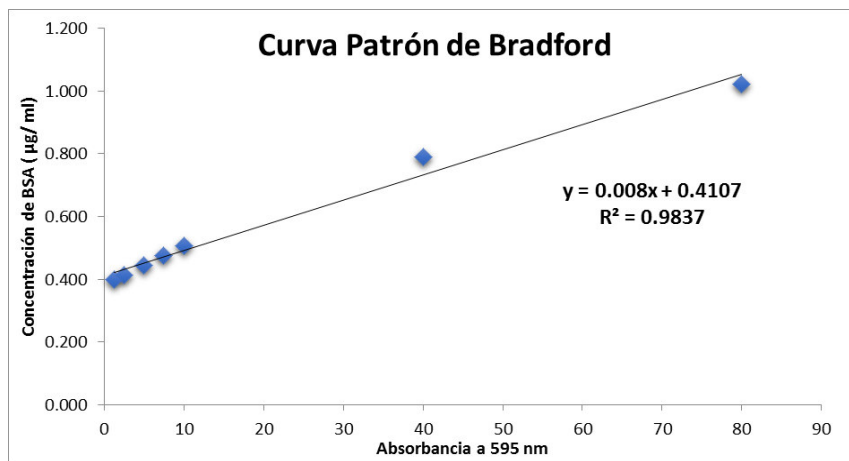


FIGURA 4. Gráfica de la curva patrón para la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.

4.15.4. Electroforesis en condiciones denaturante (PAGE-SDS)

Se tomó del eluido una alícuota de 24 µL y se agregó 8 µL de buffer proteína 4X, se mezcló y se hirvió en una cocinilla por 4 min a 100 °C. La muestra obtenida fue cargada en un gel de policrilamida de 12%, se colocó 15 µL por pocillo (entre 0.2 µg – 3.2 µg de proteínas por pocillo). La corrida electroforética fue de 15 minutos a 80 V y 120 minutos a 110 V, posterior a ello, se tiñó el gel con azul de Coomassie R-250 por 1 hora y se destiñó el gel con solución de desteñido rápido (50% CH₃OH, 40% H₂O, 10% CH₃COOH) por 1

hora y con desteñido lento (5% CH₃OH, 85% H₂O, 10% CH₃COOH) por 4 horas aproximadamente. Se fotografió el gel y se analizó usando el programa QuantityOne 4.6.9 1-D Analysis Software.

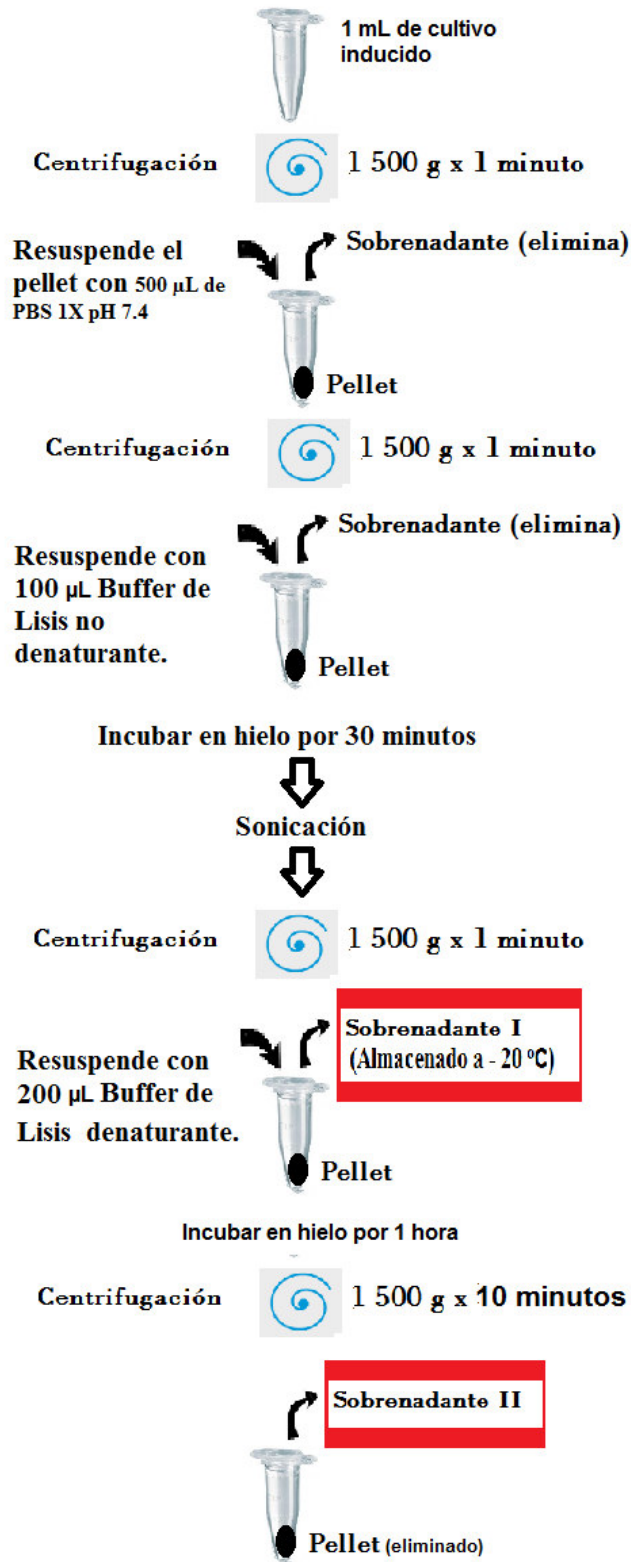


FIGURA 5. Protocolo de lisado y obtención de proteínas del cultivo inducido.

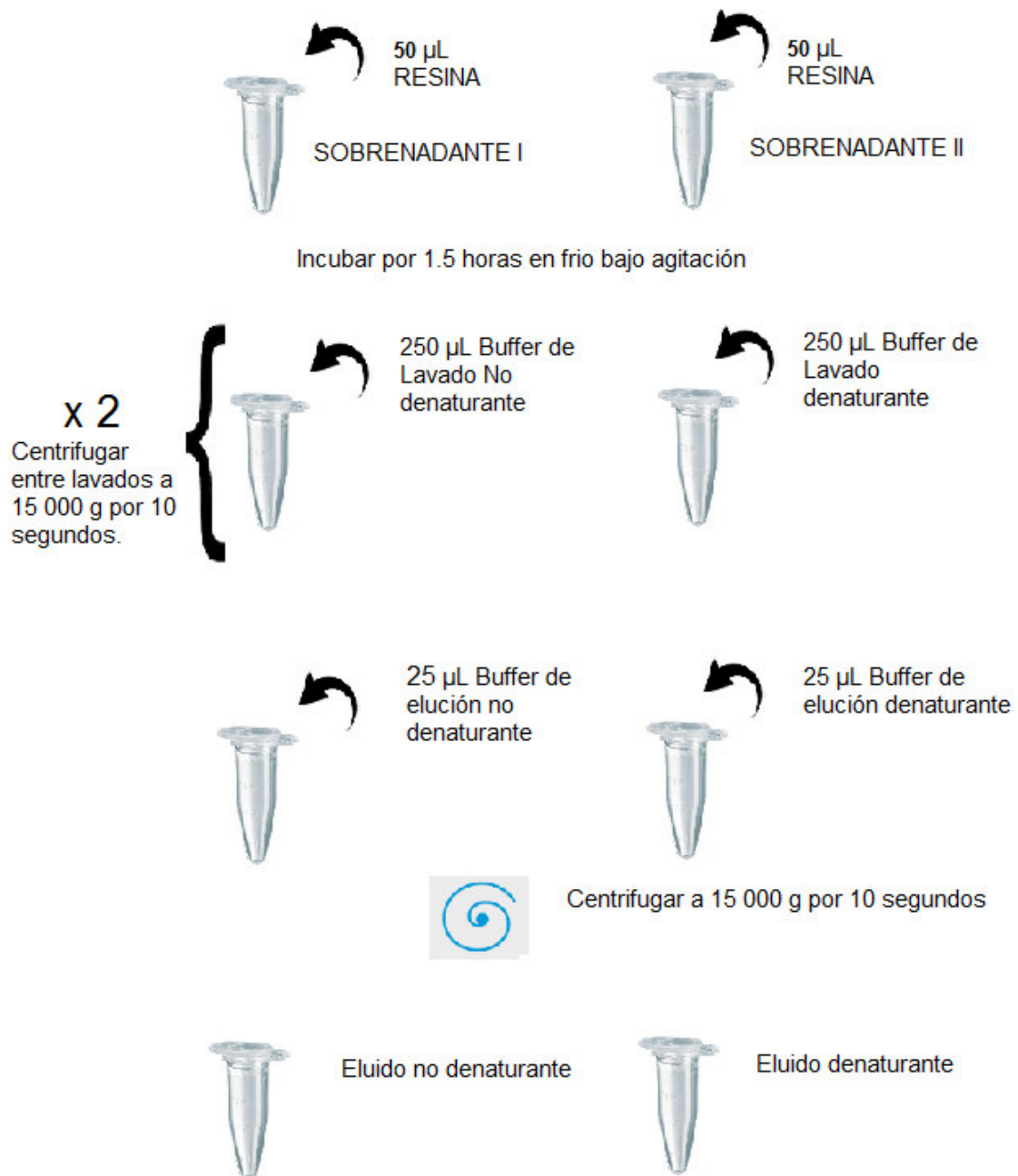


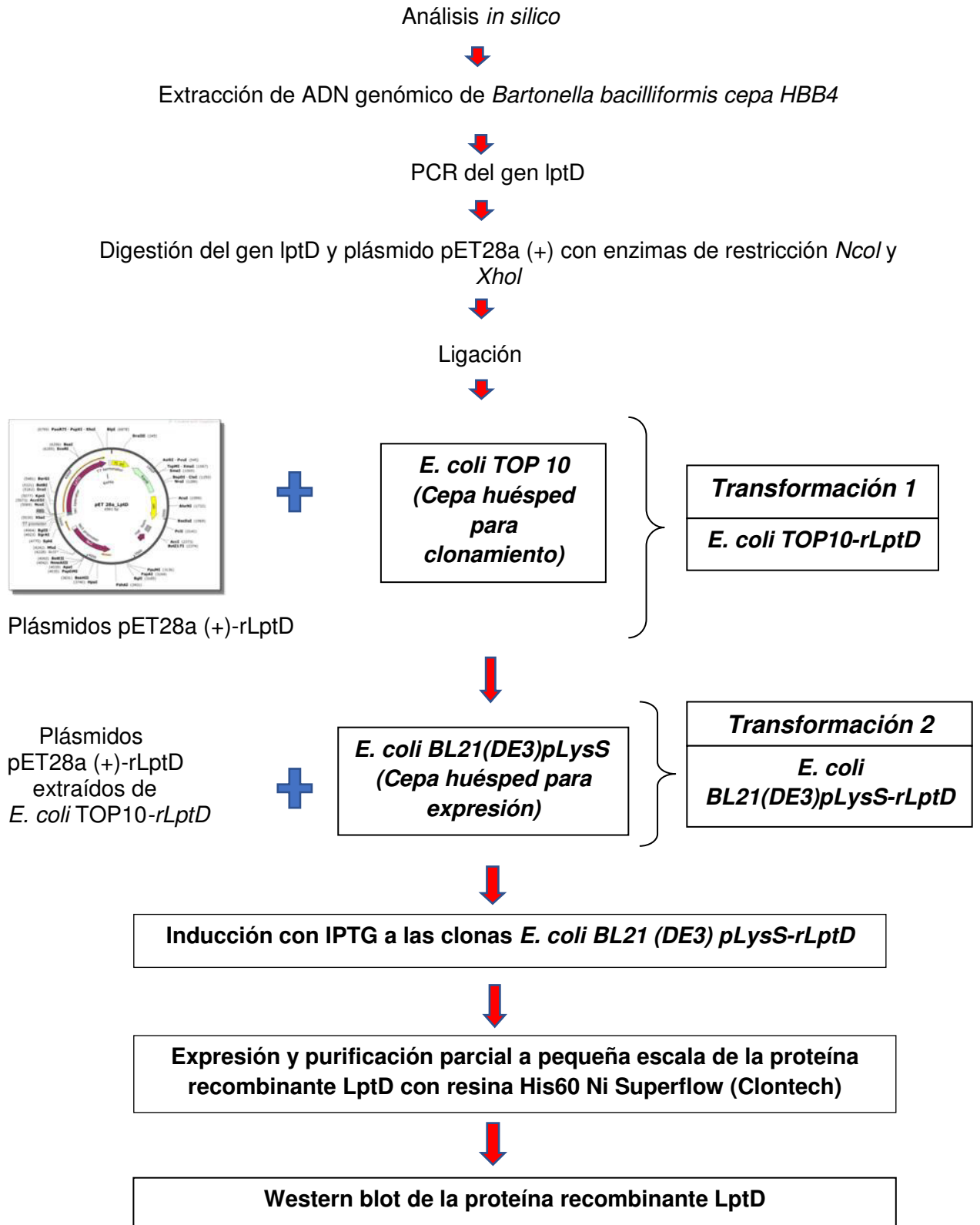
FIGURA 6. Protocolo de purificaci3n de prote3nas por cromatograf3a de afinidad.

4.16. Western Blot

El ensayo de Western Blot es una prueba confirmatoria que se basa en el reconocimiento específico de un anticuerpo y un antígeno. Este ensayo se realizó con la finalidad de evaluar si los sueros de pacientes que sufrieron la enfermedad de Carrión reconocían a la proteína recombinante. Cabe mencionar que los sueros provienen de la seroteca del Laboratorio Biotecnología y Biología Molecular (INS).

El primer paso fue realizar una electroforesis denaturalizante en geles de policrilamida al 10 % de las proteínas expresadas y luego transferidas desde el gel hacia la membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-seco horizontal, usando 3 mA/ cm² por 30 minutos, no excediéndose de 25 V. Se bloqueó la membrana con solución de bloqueo (TBS 1X con BSA al 3%), por 1 hora con agitación moderada a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con buffer de lavado (TBS 1X con Tween-20 al 0.05%) durante 5 minutos cada vez con agitación moderada. Se añadió una mezcla de 5 sueros diluidos al 0.1% en TBS 1X. Se incubó la membrana con los sueros por 16 horas en hielo con movimiento. Se lavó 3 veces con buffer de lavado, durante 5 minutos cada vez con agitación moderada. Se añadió anti-IgG humano (Fab específico) conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido 1/1000 con TBS 1X, y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación moderada. Se lavó 2 veces con buffer de lavado y una vez con TBS, durante 5 minutos cada vez en agitación moderada. La detección de la proteína recombinante fue realizada con el sustrato (9 mL TBS1X, 1 mL 0.5% α cloronaphthol diluido en etanol, 10 μ L peróxido de hidrógeno), dicho reactivo actuó por 5 minutos y luego se lavó la membrana con agua destilada hasta la aparición de las bandas específicas. Por último, se fotografió la membrana y fueron analizadas con el programa QuantityOne 4.6.9 1-D Analysis Software.

5. ESQUEMA RESUMIDO SOBRE LA METODOLOGÍA



6. RESULTADOS

6.1. Análisis bioinformático

6.1.1. Proteínas de membrana externa de *Bartonella bacilliformis*.

El programa SignalP4.1 luego de analizar 1543 proteínas del proteoma de *B. bacilliformis* KC583 nos mostró un total de 67 proteínas que contaban con péptido señal, los cuales fueron evaluados con el programa VaxiJen, resultando que 57 de éstas eran probables antígenos (probabilidad > 0.4). En relación a la localización celular, evaluado con el programa Vaxign, 12 proteínas están presentes en la membrana externa (**Tabla 11**); 3 proteínas ubicadas en el medio extracelular; 6, en el citoplasma; 8, en la membrana citoplasmática; 8, en el periplasma; y 30, el análisis *in silico* no llegó a determinar su localización clasificándolas como de ubicación desconocida. El programa Vaxign también nos mostró la probabilidad de adhesión de cada proteína.

Según los resultados obtenidos en el programa Vaxijen, solo 4 proteínas: Peptidil-prolilcic-transisomerasa B (ID: ABM45268.1), Supuesta proteasa Do (ABM45135.1), Proteína del dominio PPIASE tipo PPIC (ID: ABM44920.1) y Proteasa Do (ID: ABM44594.1) mostraron similitud con proteínas humanas, de ratón y de cerdo.

Se escogió a la proteína de tolerancia a solventes orgánicos con ID Genbank: ABM45510.1, por cumplir con los criterios de selección del candidato vacunal (**Tabla 12**). Cabe resaltar que la proteína seleccionada posee otras 2 denominaciones: proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos – D (LptD) (nombre dado en UNIPROT) ID: A1US68_BARBK; y proteína de la membrana externa Imp, requerida para la biogénesis de la membrana externa / Precursor de proteína de tolerancia a solvente orgánico (nombre dado en Patric). ID: 360095.6.peg.489. En el presente trabajo utilizaremos la denominación dada en Uniprot: Proteína de ensamblaje de lipopolisacáridos – D (LptD).

TABLA 11. Lista de proteínas localizadas en la membrana externa de *B. bacilliformis*

Nº	PROTEÍNAS CON PÉPTIDO SEÑAL (SIGNALP4.1)	ID Protein (Genbank)	Probabilidad de ser Antígeno (VaxiJen)	CARACTERÍSTICAS DEL ANTÍGENO (Vaxign)				
				Localización celular	Probabilidad	Probabilidad de Adhesión	Hélices Trans-membrana	Longitud de la proteína (aa)
1	TonB	ABM45677.1	0.5749 (Probable Antígeno)	Membrana externa	1	0.424	0	703
2	Proteína de tolerancia a solventes orgánicos o LptD o Imp	ABM45510.1	0.5615 (Probable Antígeno)	Membrana externa	1	0.520	0	756
3	Omp19	ABM45499.1	0.5381 (Probable Antígeno)	Membrana externa	0.992	0.350	0	150
4	ToIC	ABM45367.1	0.5719 (Probable Antígeno)	Membrana externa	1	0.235	0	402
5	Autotransportador de membrana externa	ABM45246.1	0.6554 (Probable Antígeno)	Membrana externa	0.949	0.650	0	799
6	Lipoproteína asociada a peptidoglucanos	ABM45100.1	0.5813 (Probable Antígeno)	Membrana externa	1	0.155	0	151
7	Proteína de membrana externa de secreción tipo I	ABM45066.1	0.5729 (Probable Antígeno)	Membrana externa	1	0.301	0	379
8	Proteína de membrana externa de la familia omp25_ropB	ABM44927.1	0.5453 (Probable Antígeno)	Membrana externa	1	0.380	0	258
9	Proteína de membrana externa familia omp25_ropB	ABM44815.1	0.6012 (Probable Antígeno)	Membrana externa	1	0.375	0	262
10	Autotransportor de la membrana externa	ABM44634.1	0.5587 (Probable Antígeno)	Membrana externa	0.949	0.324	0	1033
11	Proteína de la familia porina	ABM44571.1	0.5571 (Probable Antígeno)	Membrana externa	0.992	0.508	0	384
12	Supuesta lipoproteína	ABM44504.1	0.6123 (Probable Antígeno)	Membrana externa	0.992	0.527	0	99

TABLA 12. Criterios de selección de la proteína LptD

CRITERIOS DE SELECCIÓN	PROTEÍNA LPTD
Alta probabilidad de ser antígeno (> 0.5).	Sí (probabilidad: 0.5615)
Localización en la membrana externa	Sí (probabilidad: 1)
No presentar similitud con proteínas humanas, de ratón, o de cerdo.	Sí cumple con el criterio
Longitud de la proteína debe ser mayor a 10 kDa	756 aa < > 86.80KDa(Tamaño mediano)
No ser una proteína utilizada en otro estudio y/o que esté patentada	Sí cumple con el criterio

Las secuencias nucleotídicas del gen lptD fue obtenida de la base de datos Genbank y las secuencias aminoacídicas de la proteína LptD fue obtenida de la base de datos Uniprot, ambas se muestran en formato fasta en el **Anexo B.1 y B.2.**

6.1.2. Caracterización y modelización de LptD

El LptD posee un péptido señal desde el aminoácido 1 - 35 y la cadena propiamente dicha desde el aminoácido 36 – 791. La secuencia aminoacídica del dominio extracelular va desde el aminoácido 218 – 791. Se caracterizó la proteína completa LptD y el dominio extracelular de LptD, se encontraron diferencias mínimas. Ambas son de mediano peso molecular (< 100 kDa), en cuanto a la composición aminoacídica el dominio extracelular de LpTD tiende a ser neutral mientras que LpTD posee mayor cantidad de residuos cargados positivamente, la vida media en *E. coli* en ambos casos es de aproximadamente 10 horas, son consideradas proteínas estables (< 40), poseen índices de hidroficidad negativo, en consecuencia, LpTD es hidrofílico lo cual nos confirma su ubicación hacia el medio extracelular (**Tabla 13**).

TABLA 13. Características de la proteína LptD (mediante software ProtParam)

Características	LpTD	Dominio extracelular de LptD
Tamaño	791.00 aa	584 aa
Peso Molecular (kDa)	90.58	67.42
pl teórico	8.71	7.86
Composición aminoacídica	69 residuos cargados negativamente (Asp + Glu) 75 residuos cargados positivamente (Arg + Lys)	52 residuos cargados negativamente (Asp + Glu) 53 residuos cargados positivamente (Arg + Lys)
Composición atómica	4 095 (Carbonos) 6 189 (Hidrógenos) 1 111 (Nitrógenos) 1 201 (Oxígenos) 12 (Azufres)	3 047 (Carbonos) 4 521 (Hidrógenos) 837 (Nitrógenos) 893 (Oxígenos) 8 (Azufres)
Estimación de vida media	30 horas (reticulocitos de mamífero, <i>in vitro</i>) > 20 horas (levadura, <i>in vivo</i>) > 10 horas (<i>E.coli</i> , <i>in vivo</i>)	30 h (reticulocitos de mamífero, <i>in vitro</i>) >20 h (levadura, <i>in vivo</i>) >10h (<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>)
Índice de inestabilidad	36.28 (Se clasifica como proteína estable)	35.21 (Se clasifica como proteína estable)
índice alifático	76.36	67.33
Promedio de hidrofobicidad	-0.441	-0.570

En el presente trabajo se escogió trabajar con el dominio extracelular de LptD por ser la porción de la proteína LptD que se ubica hacia el medio extracelular. El dominio extracelular de LptD forma un canal (**Figura 7**), posee como aminoácidos más abundantes a la asparagina (8.9%) y a la serina (8.4%). El programa RaptorX logró modelar el 100% de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de LptD y usó como plantillas a proteínas homólogas de LptD de diferentes especies: *E. coli* (PDB: 4RHBA), *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 5IVA), *Yersinia pestis* (5IXMA) y *Shigella flexneri* (PDB: 4Q35A). La cola de histidina se ubica en la región C-terminal de la proteína

(Figura 8). Existen regiones desordenadas, las cuales se ubican en los extremos N (MVPDPAEKRV) y C terminal (ADFGQKIKLNLLEHHHHH) (Figura 9).

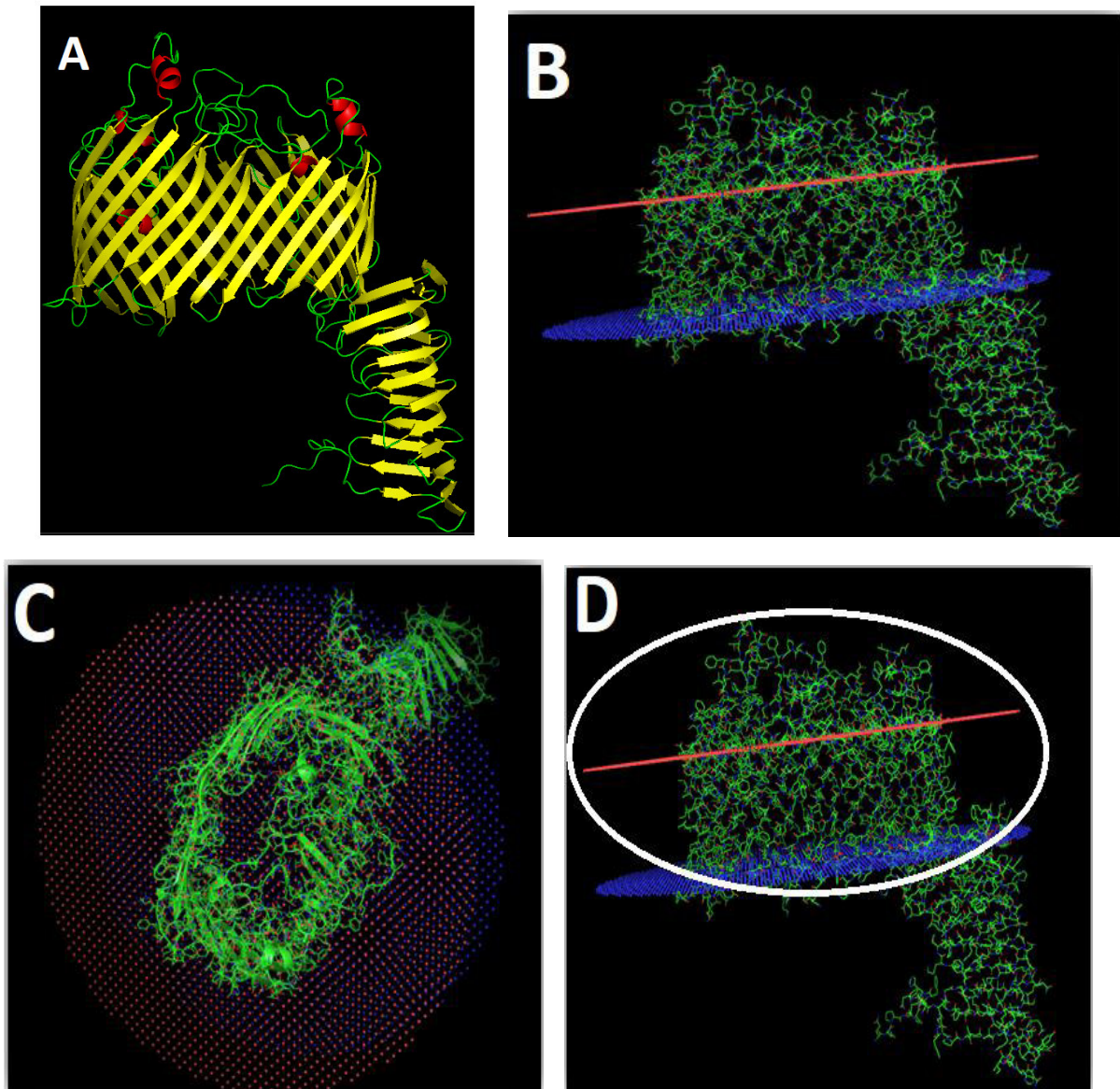


FIGURA 7. Modelo tridimensional de la proteína LptD. (A) Estructura 3D de LptD. **(B)** Ubicación espacial de LptD (plano en rojo: membrana externa y el plano azul: membrana interna). **(C)** Vista superior de la ubicación espacial de LptD. **(D)** Dominio extracelular de LptD encerrado en un círculo blanco.

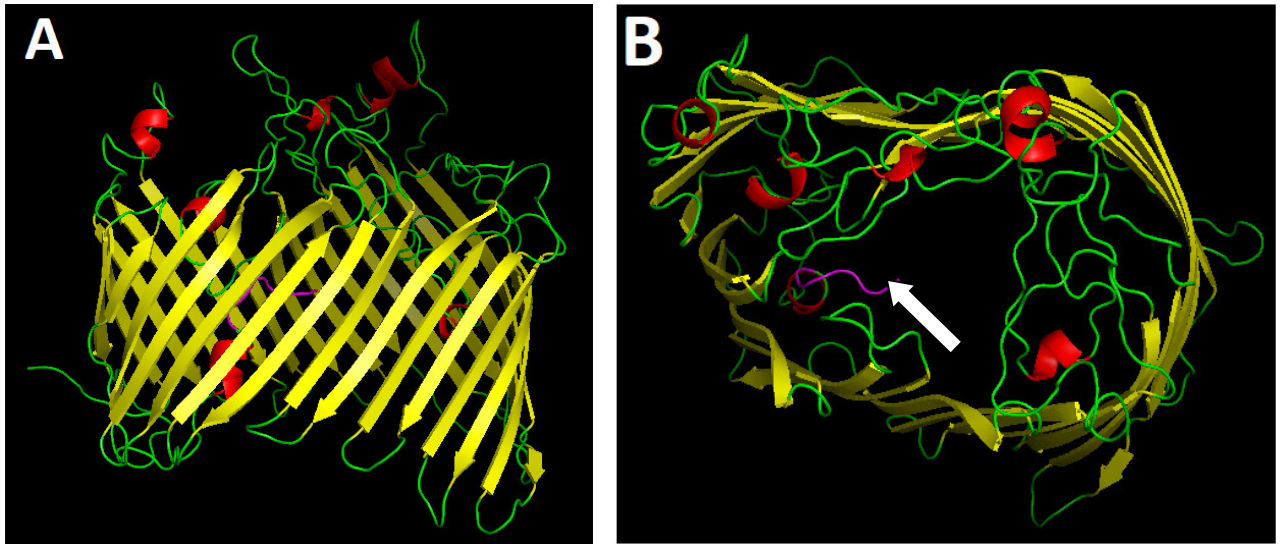


FIGURA 8. Modelo 3D del dominio extracelular de LptD. (A) Vista lateral, (B) Vista superior. Estructuras secundarias: láminas beta (de color amarillo), hélice alfa (de color rojo), loops (de color verde) y la cola histidina de color morado (flecha blanca).

A nivel estructural el dominio extracelular de LptD presenta una naturaleza mixta, debido a que posee láminas beta (52%) y alfa hélice (1%). LptD presenta 25 láminas beta, ello porta una estructura rígida a la proteína lo cual va acorde con su función de canal. El 34% de su estructura está expuesta a solventes y un 5% presenta regiones desordenadas **(Tabla 14)**.

El modelo 3D de la proteína LptD presenta un porcentaje mayor al 90% de regiones favorables lo que lo hace un modelo predictivo aceptable **(Tabla 15)**.



FIGURA 9. Ubicación de las regiones desordenadas del dominio extracelular de LptD. Regiones desordenadas (en rojo) y regiones ordenadas (en azul) (RaptorX).

TABLA 14. Propiedades del dominio extracelular de LptD

Estructura Secundarias	1% de hélice alfa	52% de Lámina beta	46% de Loops
Acceso al Solvente	34% Expuesto	48% Medio	17% Enterrado
Regiones desordenadas	5%		

TABLA 15. Análisis de Ramachandran del modelo 3D del dominio extracelular de LptD

Número de Residuos	Cantidad / Porcentaje
En regiones favorables	688 (91.2%)
En regiones permitidas	48 (6.4%)
En regiones aisladas	18 (2.4%)

6.1.3. Identificación de epítopes del dominio extracelular de LptD

Los péptidos que poseían un score mayor a 0.5 son considerados como antígenos, este criterio se utilizó tanto para los antígenos lineales como para los conformacionales, se hallaron 18 antígenos lineales y 5 antígenos conformacionales (**Tabla 16 y 17**). La visualización 3D de los epítopes mostró su orientación hacia el medio extracelular o hacia el periplasma, con orientación hacia el medio extracelular ubicamos 7 epítopes lineales (epítopes lineales: 4, 6, 7, 8, 12, 13 y 15) y 4 epítopes conformacionales (epítopes conformacionales: 1, 2, 3 y 5) (**Figura 10 y 11**).

TABLA 16. Epítopes lineales del dominio extracelular de LptD

No. de Nº. Péptido	Inicio	Fin	Epítopes lineales	Número de Residuos	Score
1	499	508	GVKLSNNWSI	10	0.812
2	1	20	MVPDPAEKRVSGLLTPHFFY	20	0.765
3	75	95	HIYQTNPHNFENNTVDAQNTN	21	0.762
4	188	203	YFLTPEEPVYAGELTF	16	0.76
5	526	539	INLSYIDECFGITF	14	0.741
6	106	111	RINSRW	6	0.731
7	435	441	VNHDNGF	7	0.723
8	215	225	AAGFNDDWQN	11	0.719
9	247	343	LEWKKRFNTQNGFIIPTLALRADTIAINAHENYNAH TLNSSSTKFNVAASSAIRSMATIGLELRYPFLITSEIS THILEPTVQVFIRNNEHHVGQF	97	0.708
10	24	56	LGFGIKNSYFWNLSPHYDFTLSGTFYTKQGLLT	33	0.67
11	554	572	KNFNFSLSLRTIADFGQKI	19	0.658
12	374	394	TRANIGLRYSGNLSKNWSFYS	21	0.632
13	414	427	INTGFYSGIETARS	14	0.624
14	147	154	GLTGKNYF	8	0.615
15	60	67	WRQHFKTG	8	0.609
16	516	520	LVSrk	5	0.563
17	400	405	FHLAGK	6	0.536
18	465	472	QKWSNLWI	8	0.534

TABLA 17. Epítopes conformacionales del dominio extracelular de LptD

No.	Epítopes conformacionales	Número de Residuos	Score
1	_:N219, _:D220, _:T221, _:D222	4	0.876
2	_:M1, _:V2, _:P3, _:D4, _:P5, _:A6, _:E7, _:K8, _:R9, _:V10, _:S11, _:G12, _:L13, _:L14, _:T15, _:P16, _:F18, _:Y20, _:L24, _:G25, _:F26, _:G27, _:I28, _:N30, _:S31, _:Y32, _:F33, _:W34, _:N35, _:L36, _:S37, _:P38, _:H39, _:Y40, _:F42, _:L44, _:G46, _:F48, _:T50, _:K51, _:Q52, _:G53, _:L54, _:W60, _:Q62, _:H63, _:F64, _:K65, _:T66, _:G67, _:H75, _:I76, _:Y77, _:Q78, _:T79, _:N80, _:P81, _:H82, _:N83, _:F84, _:E85, _:N86, _:N87, _:T88, _:V89, _:D90, _:A91, _:Q92, _:N93, _:T94, _:N95, _:R106, _:I107, _:N108, _:S109, _:R110, _:W111, _:G147, _:L148, _:T149, _:G150, _:K151, _:N152, _:F154, _:Y188, _:L190, _:T191, _:P192, _:E193, _:E194, _:P195, _:V196, _:Y197, _:A198, _:G199, _:E200, _:L201, _:T202, _:F203, _:H214, _:T231, _:Q232, _:L233, _:S234, _:G235, _:I236, _:A237, _:G238, _:F241, _:L243, _:W249, _:K250, _:K251, _:R252, _:F253, _:N254, _:T255, _:Q256, _:N257, _:G258, _:F259, _:I260, _:I261, _:I262, _:P263, _:T264, _:L265, _:T271, _:I272, _:A273, _:I274, _:N275, _:A276, _:H277, _:E278, _:N279, _:Y280, _:N281, _:A282, _:H283, _:T284, _:L285, _:N286, _:S287, _:S288, _:S289, _:T290, _:K291, _:F292, _:N293, _:V294, _:A295, _:S296, _:S297, _:A298, _:A299, _:I300, _:I306, _:G307, _:L308, _:L310, _:R311, _:Y312, _:P313, _:F314, _:L315, _:I316, _:T317, _:S318, _:E319, _:I320, _:S321, _:T322, _:H323, _:I324, _:L325, _:E326, _:P327, _:V329, _:V331, _:I333, _:N335, _:N336, _:E337, _:H338, _:H339, _:V340, _:G341, _:Q342, _:F343, _:G372, _:T374, _:A376, _:I378, _:G379, _:L380, _:Y382, _:S383, _:G384, _:N385, _:L386, _:S387, _:K388, _:N389, _:S391, _:F392, _:S394, _:F400, _:L402, _:A403, _:G404, _:K405, _:N406, _:S407, _:F408, _:A409, _:I414, _:N415, _:T416, _:G417, _:F418, _:Y419, _:S420, _:G421, _:I422, _:E423, _:T424, _:A425, _:R426, _:S427, _:V435, _:N436, _:H437, _:D438, _:N439, _:G440, _:F441, _:N450, _:K451, _:I452, _:T453, _:G454, _:K455, _:Q465, _:W467, _:S468, _:N469, _:L470, _:I472, _:G499, _:V500, _:K501, _:L502, _:S503, _:N504, _:N505, _:W506, _:S507, _:I508, _:L528, _:S529, _:Y530, _:I531, _:D532, _:E533, _:C534, _:F535, _:G536, _:I537, _:T538, _:F539, _:F558, _:S559, _:L560, _:S561, _:L562, _:R563, _:T564, _:I565, _:A566, _:D567, _:F568, _:G569, _:Q570, _:K571, _:I572	286	0.717
3	_:A215, _:A216, _:G217, _:F218, _:W223, _:Q224, _:N225, _:L228	8	0.624
4	_:L247, _:L267, _:A304	3	0.58
5	_:V517, _:S518, _:R519, _:K520	4	0.577

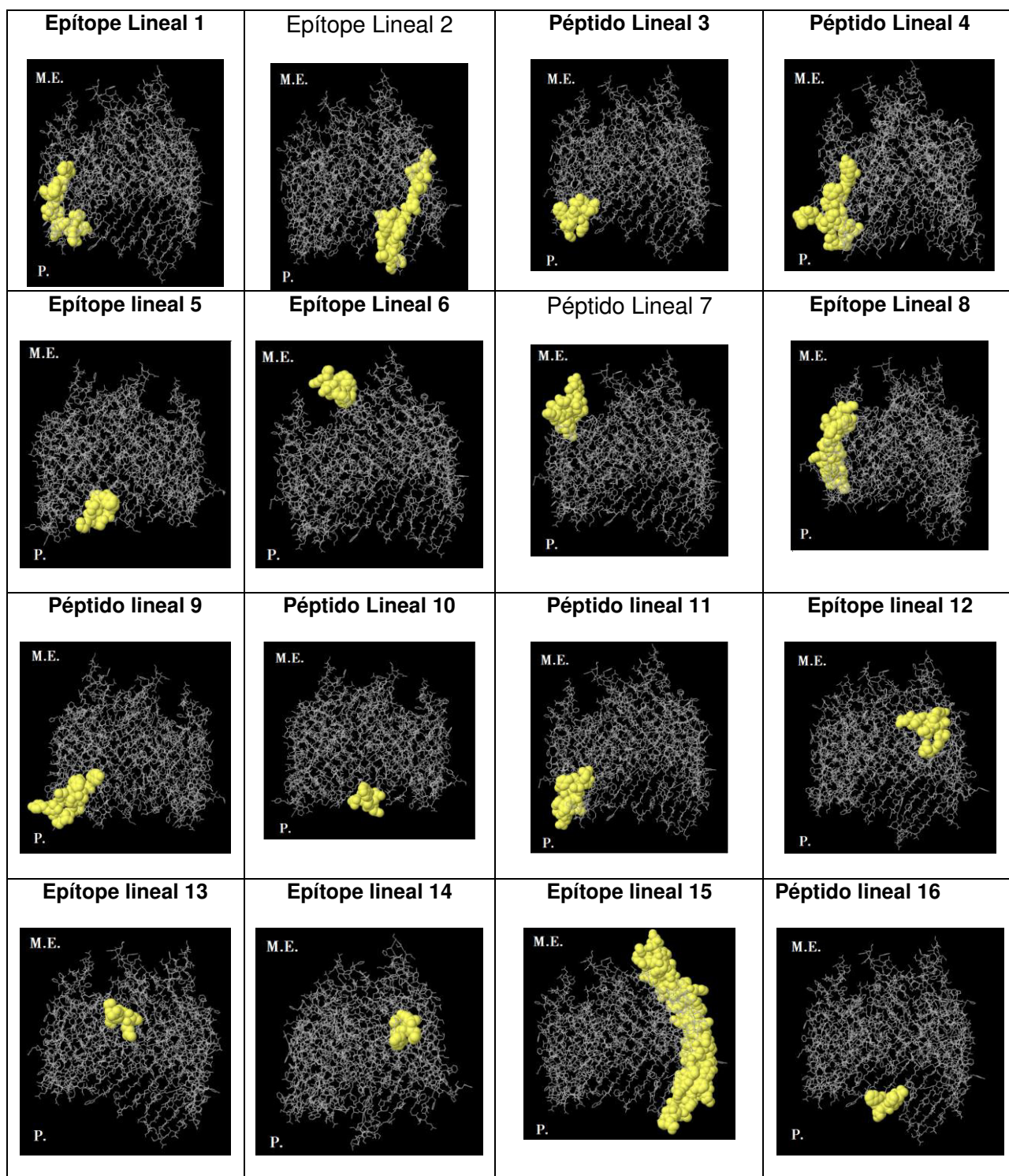


FIGURA 10. Epítotos lineales del dominio extracelular de LptD (resaltado de color amarillo). Donde: M.E. (Medio extracelular), P (Periplasma).

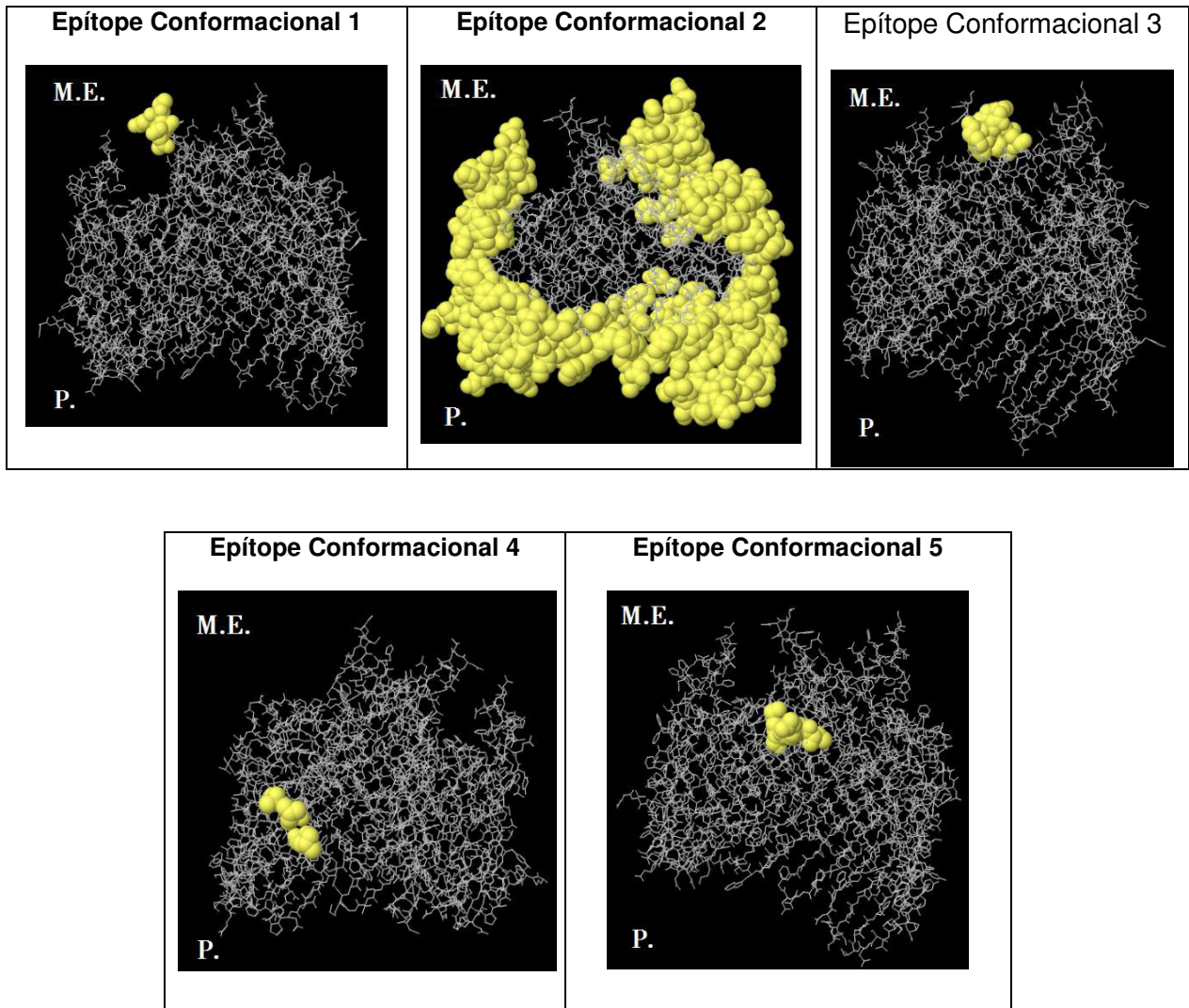


FIGURA 11. Epítotos conformacionales del dominio extracelular de LptD (resaltado de color amarillo). Donde: M.E. (Medio extracelular), P. (Periplasma).

6.1.4. Evaluación de la toxicidad del dominio extracelular de LptD

Mediante el programa ToxinPred se evaluó la toxicidad del dominio extracelular de LptD, dicho programa evaluó 569 péptidos de la proteína de los cuales ninguno resultó ser tóxico, en el **Anexo C** se muestra la lista completa de los péptidos evaluados.

6.1.5. Cobertura de protección poblacional de los péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II

Los péptidos del dominio extracelular de LptD que mostraron unión fuerte a los HLA-I y HLA-II (**Tabla 18**), fueron utilizados para predecir el porcentaje de cobertura en la población peruana, sudamericana y mundial. La lista completa de los péptidos que se unen a los HLA se ha colocado en el **ANEXO D**.

El porcentaje de cobertura poblacional a nivel Nacional fue del 100 %; a nivel de Sudamericano, 93.38%; y a nivel Mundial, 99.28% (**Tabla 19**).

6.2. Cultivo de *B. bacilliformis*

Se cultivó *B. bacilliformis* cepa HBB4, las colonias eran de pequeño a mediano tamaño, borde entero, puntiformes, blanquecinas y poco adheridas al agar. Las colonias se aprecian a partir de las 3 - 4 semanas. El medio sólido de cultivo se tornaba oscuro y el medio líquido se tornaba turbio debido a la hemólisis de la sangre de carnero, ello ocurría a partir de las 3 semanas de cultivo (**Figura 12**).

El medio de cultivo enriquecido de *B. bacilliformis* hace que sea propenso a contaminarse por bacterias ambientales u hongos, por ello todo el proceso de siembra se realiza en condiciones de esterilidad.



FIGURA 12. Cultivo de *B. bacilliformis*. Frasco de cultivo de 8 semanas de *B. bacilliformis* cepa HBB4.

TABLA 18. Péptidos de unión fuerte a HLA-I y HLA-II

Péptidos del dominio extracelular de LptD que muestran unión fuerte con HLA-I		
Subclase de HLA-A	% de Afinidad	Péptido
HLA-A*02:01	0.0447	SLVGQSFHL
HLA-A*23:01	0.0069	IYQTNPHNF
HLA-A*24:02	0.0037	IYQTNPHNF
HLA-A*31:01	0.0372	AQSDPHFSR
HLA-A*68:01	0.0314	MVPDPAEKR
HLA-A*01:01	0.1600	ATIGLELRY
HLA-A*03:01	0.0279	VSYDLVSRK
HLA-A*26:01	0.0098	FVFDSTTLF
HLA-A*30:01	0.0456	RTIADFGQK
HLA-A*33:01	0.0093	NFNFSLSLR
Subclase de HLA-B	% de Afinidad	Péptido
HLA-B*07:02	0.1757	YPFLITSEI
HLA-B*15:01	0.0270	IQNQPDY EY
HLA-B*35:01	0.0016	FPNEDAQSF
HLA-B*39:01	0.0066	YHFQIQDSM
HLA-B*40:01	0.0324	HENYNAHTL
HLA-B*44:02	0.0010	NEIEASQKW
HLA-B*48:01	0.0955	KNFNFSLSL
HLA-B*51:01	0.0043	YPFLITSEI
HLA-B*08:01	0.0420	TGKIRRNEI
HLA-B*14:01	0.0335	YHFQIQDSM
HLA-B*18:01	0.0191	NEDAQSFVF
HLA-B*27:02	0.0103	KRFNTQNGF
HLA-B*38:01	0.0072	NHSQQAWVL
HLA-B*49:01	0.0500	QEISFQTGV
HLA-B*52:01	0.0779	LELRYPFLI
Péptidos del dominio extracelular de LptD que muestran unión fuerte con HLA-II		
Subclase de HLA-II	% de Afinidad	Péptido
HLA-DRB1*04:01	0.01	RKFVKQGINLS
HLA-DRB1*08:01	0.67	NFSLSLRTIAD
HLA-DRB1*0901	0.03	TKFNVASSAAI
HLA-DRB1*1301	0.70	AAIRSMATIGL
HLA-DRB1*0101	0.50	NFNFSLSLRTI
HLA-DRB1*0301	0.40	NVSYDLVSRKF
HLA-DRB1*0701	0.06	KNFNFSLSLRT
HLA-DRB1*1101	0.90	FNFSLSLRTIA
HLA-DRB1*1501	1.00	GFIIIPTLALR
HLA-DRB1*1602	0.25	WSFYSLVGQSF

TABLA 19. Cobertura poblacional de los péptidos dominantes de unión a HLA clase I y clase II

Área/Población	HLA clase I y clase II combinadas
	Cobertura
Perú	100.00%
Sudamérica	93.38%
Mundo	99.28%

6.3. Extracción de ADN Genómico de *B. bacilliformis*

El ADN genómico de *B. bacilliformis* cepa HBB4 fue extraído con éxito, la pureza e integridad del ADN obtenido se verificó a través de la presencia de una única banda de alto peso molecular en el gel de agarosa al 1% (**Figura 13**).

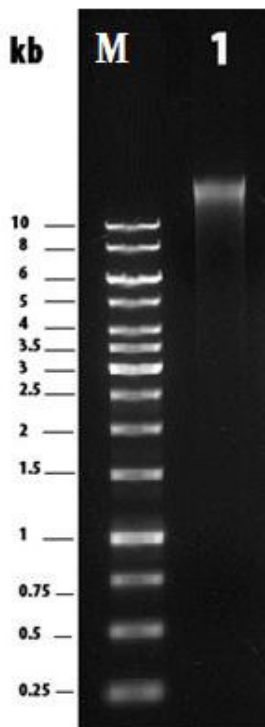


FIGURA 13. ADN genómico de *B. bacilliformis*. Carriles: (L) marcador de peso molecular en el rango de 10 a 0.25 kb (GeneRuler 1 kb ADN Ladder, Fermentas), (1) ADN de *B. bacilliformis* (flecha indica la altura de la banda de ADN genómico).

6.4. Optimización del PCR del gen lptD

El PCR del gen lptD (1 756 pb) logró darse a todas las temperaturas evaluadas (51 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C), siendo la temperatura óptima de 58 °C (**Figura 14**).

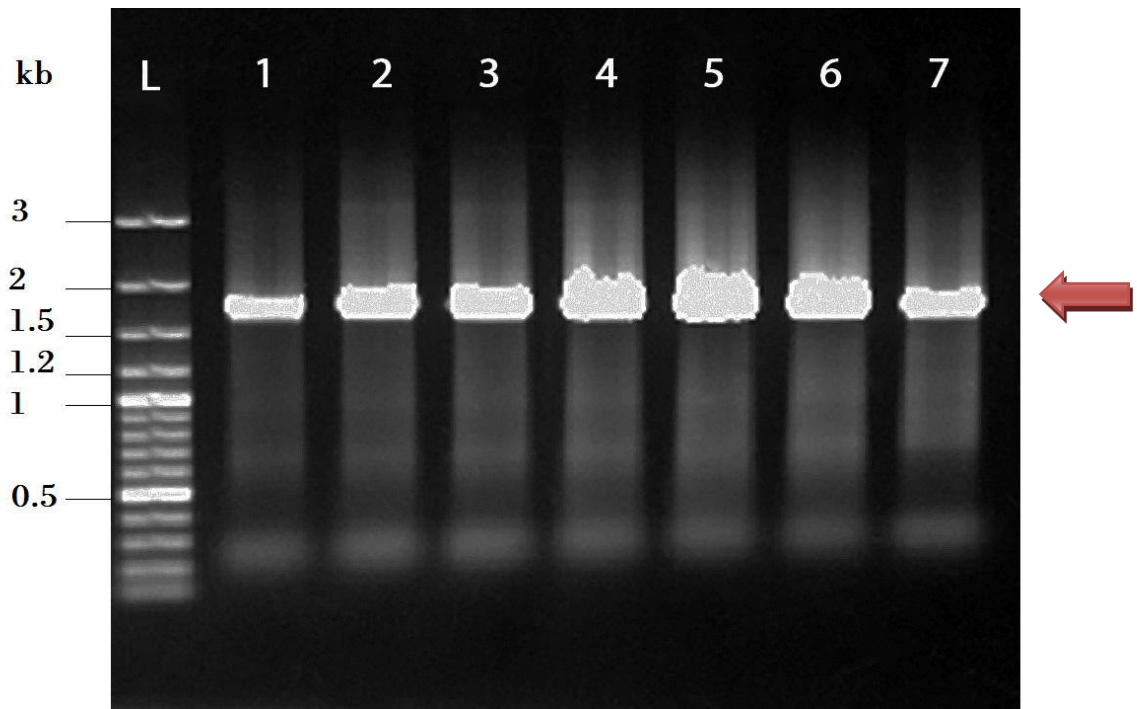


FIGURA 14. PCR. Curva de optimización de temperaturas de hibridación. Carriles: (L) marcador de peso molecular Gene ruler 100 pb Plus ADN Ladder (ThermoScientific), del (1) al (7) las temperaturas de melting evaluadas: 51 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C respectivamente. La flecha indica la altura del gen lptD amplificado (1 756 pb).

6.5. Clonamiento y transformación en *Escherichia coli* TOP10

Las cepas *E. coli* TOP10 fueron transformadas con el plásmido recombinante pET 28a(+)-rlptD. El plásmido pET28a(+) recombinante cuenta con la presencia del gen para la proteína LptD de *Bartonella bacilliformis* (pET 28a(+)-rLptD), su tamaño es de 6 961 pb, posee resistencia al antibiótico kanamicina y presenta como promotor a la ARN polimerasa T7 (**Figura 15**).

Se obtuvieron 116 colonias en la placa de ligado y 4 colonias en la placa de autoligado, lo que indica que la mayoría de bacterias transformadas en *E. coli* TOP10 presentaron plásmido pET28a(+)-rLptD. Las colonias fueron blanquecinas, redondeadas, borde uniforme y pequeñas, esas características son las esperadas en la cepa *E. coli* (Figura 16).

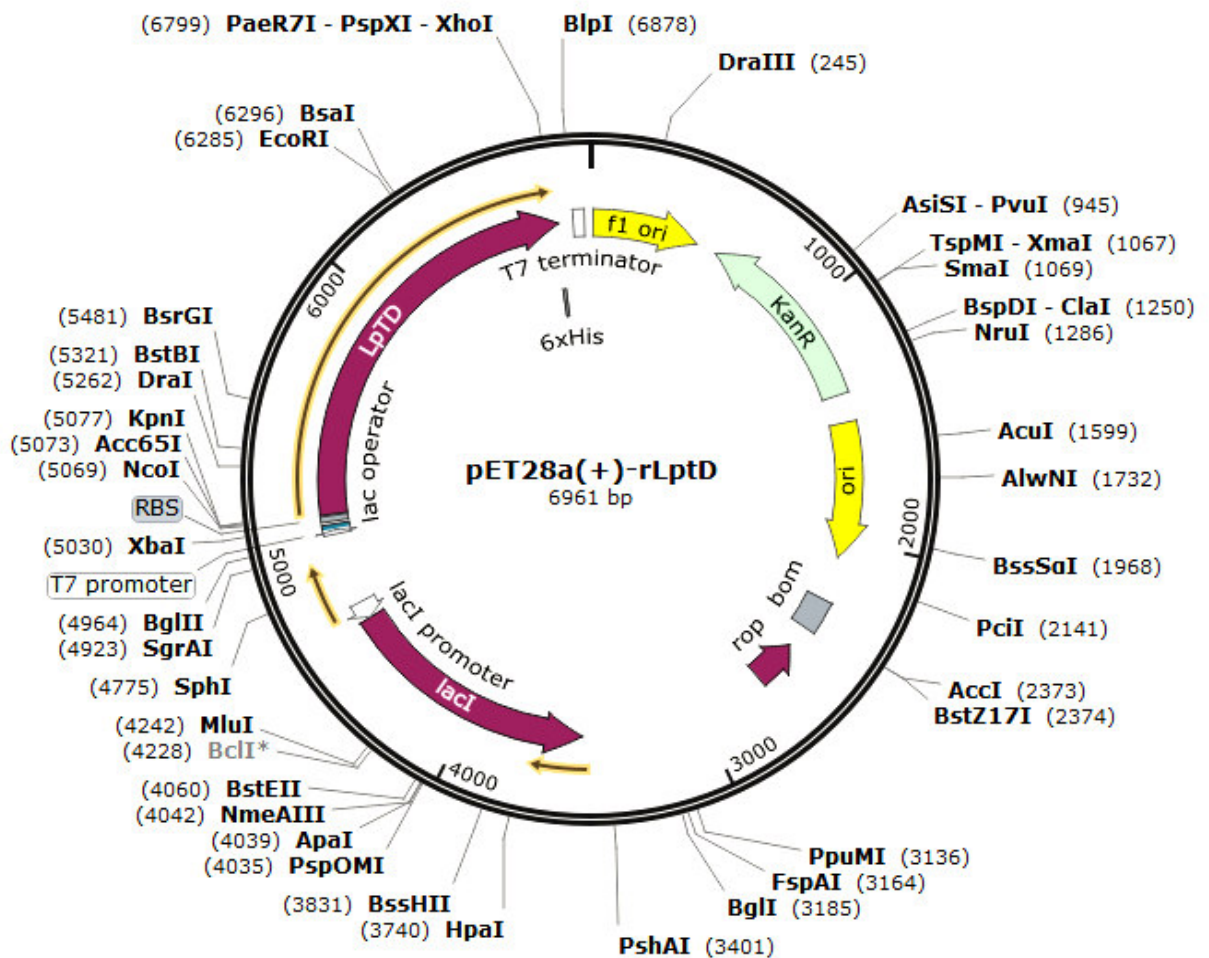


FIGURA 15. Mapa del plásmido pET 28a(+) – rLptD

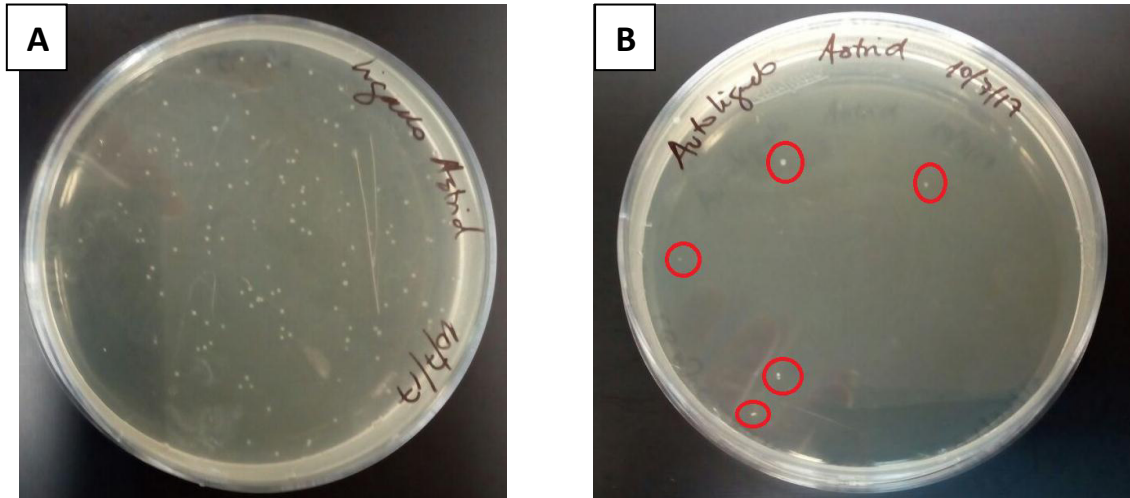


FIGURA 16. *E. coli* TOP10 transformadas. (A) Placa del Ligado (*E. coli* TOP10 –*rLptD*) (B) Placa del autoligado (*E. coli* TOP10), en rojo se encierran las colonias presentes.

Se escogieron 6 colonias de la placa de ligado (*E. coli* TOP10 – *rLptD* clona 1 – clona 6) que mostraron una adecuada forma (colonias redondas, blanquecinas, de bordes uniformes y de tamaño pequeño). Se realizó un PCR colonia a las 6 colonias escogidas y todas mostraron productos de amplificación en el tamaño esperado (1 756 pb). La clona 1 mostró diversas amplificaciones inespecíficas, tanto mayores como de menor tamaño a 1 756 pb. Se escogió a la clona 3 y 5 por no presentar amplificaciones inespecíficas, presentar una banda nítida, lo cual muestra una adecuada cantidad y estado de los productos de amplificación. El control positivo se observó una correcta amplificación del gen *lptD* del ADN genómico purificado de *B. bacilliformis* cepa *HBB4*. Por último, en el control negativo no se observó producto de amplificación, ello va acorde con lo esperado (Figura 17).

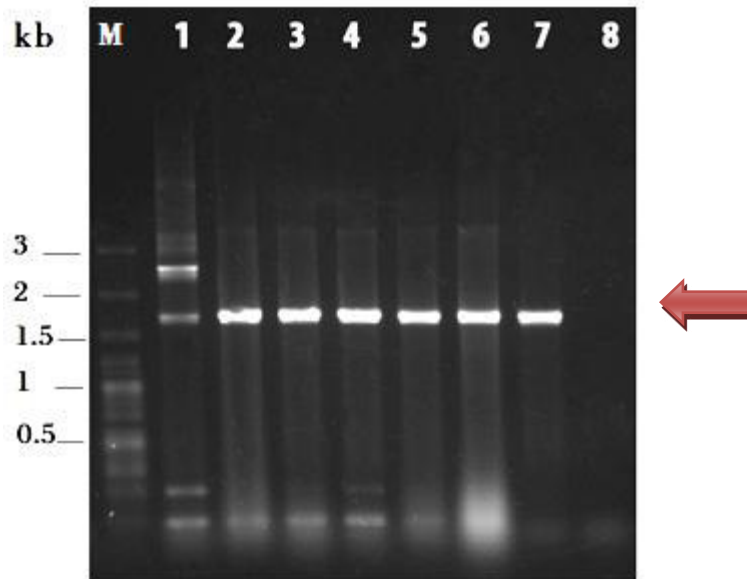


FIGURA 17. PCR de *E. coli* TOP10 – *rLptD*. Carriles: **(L)** marcador de peso molecular Gene ruler 100 pb Plus ADN Ladder (ThermoScientific), del **(1)** al **(6)** Amplificados del gen *lptD* de *E. coli* TOP10 – *rLptD*-clona 1 a la clona 6 respectivamente. **(7)** Control positivo, amplificado del gen *lptD* de *B. bacilliformis* cepa *HBB4*. **(8)** Control negativo. La flecha indica la altura del gen *lptD* amplificado (1 756 pb).

6.6. Extracción y Purificación de ADN plasmídico de *Escherichia coli* TOP10-*rLptD*

Se obtuvo una fuerte banda a la altura de 6 kDa en la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* TOP10-*rLptD* – clona 3 y 5, esas bandas corresponden al plásmido pET28a(+) – *rLptD*. (6 961 pb). La cuantificación de ADN plasmídico fue para la clona 3 de 1 661 ng/ μ L con A 260/280 igual a 1.97; y para la clona 5 fue de 1 197 ng/ μ L con A 260/280 igual a 1.98, en ambos casos la pureza del ADN plasmídico fue mayor a 1.8 lo cual muestra la alta pureza de la muestra (**Figura 18**). En el gel de agarosa también se

visualiza una banda muy por encima de la banda del ADN plasmídico, ello corresponde a ADN genómico.

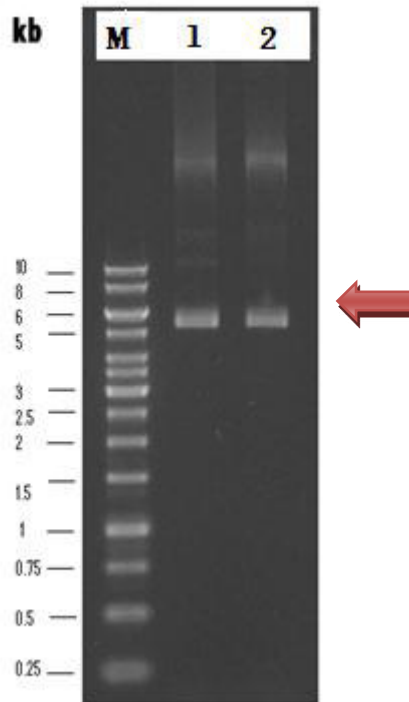


FIGURA 18. ADN plasmídico pET 28a(+)⁻ rLptD. (6 961 pb). Carriles: **(L)** marcador de peso molecular en el rango de 10 a 0.25 kb (GeneRuler 1 kb ADN Ladder, Fermentas), **(1)** ADN plasmídico de *E. coli* TOP10 – *rLptD* clona 3, **(2)** ADN plasmídico de *E. coli* TOP10 – *rLptD* clona 5. Las flechas roja indica la altura donde ubica el plásmido pET28a(+)⁻ rLptD.

6.7. Secuenciamiento

Se secuenció el gen *lptD* de *E. coli* TOP10 – *rLptD* clona 5, se logró secuenciar con el *primer forward* los primeros 1034 pb de los 1 755 pb del gen *lptD* que codifica el dominio extracelular y con el *primer reverse* desde el nucleótido 1281 al 1662. En ambos casos no

se observó cambios nucleotídicos respecto al molde (gen LptD de *B. bacilliformis* KC583)

(Figura 19)

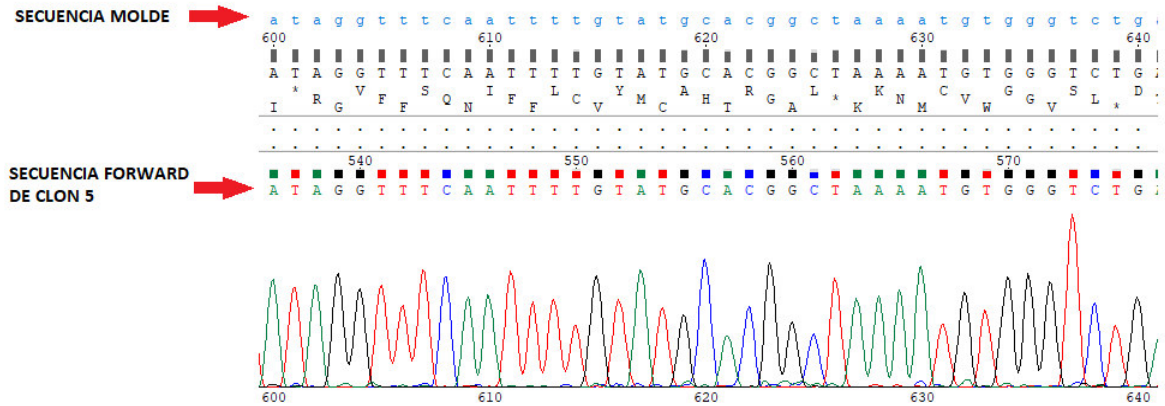


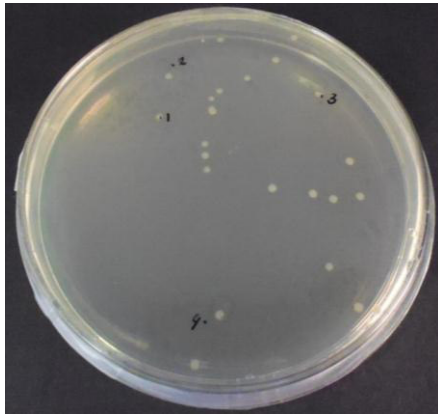
FIGURA 19 Secuenciamiento del gen *lptD* que codifica el dominio extracelular (Porción nucleotídica del 600 – 640).

6.8. Transformación en *Escherichia coli* BL21 (DE3)*pLysS*

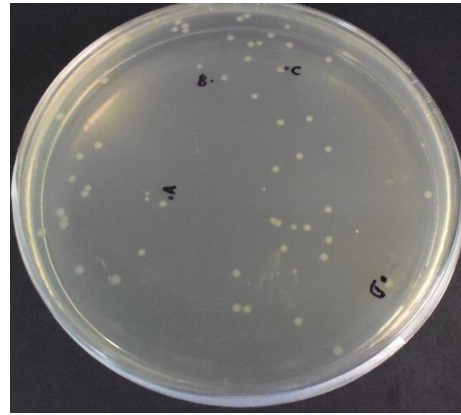
Una vez confirmadas la secuencia del gen *lptD* mediante secuenciamiento se procedió a realizar la transformación en la cepa de expresión. La transformación en *E. coli* BL21 (DE3)*pLysS* con el plásmido pET28a(+)-*rLptD*-clon 3 y clon 5, fue de acuerdo a lo esperado, las colonias que crecieron fueron blanquecinas, redondeadas, con bordes uniformes y de tamaño pequeño; en la placa de transformación de *E. coli* BL21(DE3) *pLysS* -*rLptD-clona3* crecieron 22 colonias y en la placa de transformación de *E. coli* BL21(DE3) *pLysS*-*rLptD-clona3* crecieron 54 colonias (**Figura 20**), de cada placa se escogió 4 colonias al azar para realizar PCR colonia.

El PCR confirmó la correcta transformación en *E. coli* BL21(DE3)*pLysS* de las colonias evaluadas.(**Figura 21**). A pesar que ambas clonas (*E. coli* BL21 (DE3) *pLysS*-*rLptD-clona 3* y *clona 5*) transformaron de manera correcta, se escogió a la clona 5 para los siguientes

ensayos, debido a que, bajo las mismas condiciones, la clona 5 mostró mayor cantidad de colonias transformadas en la placa que la clona 3 (58 colonias frente a 24 colonias).



E. coli BL21 (DE3) pLysS – rLptD-clon3



E. coli BL21 (DE3) pLysS – rLptD-clon5

FIGURA 20. Placas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS– rLptD.

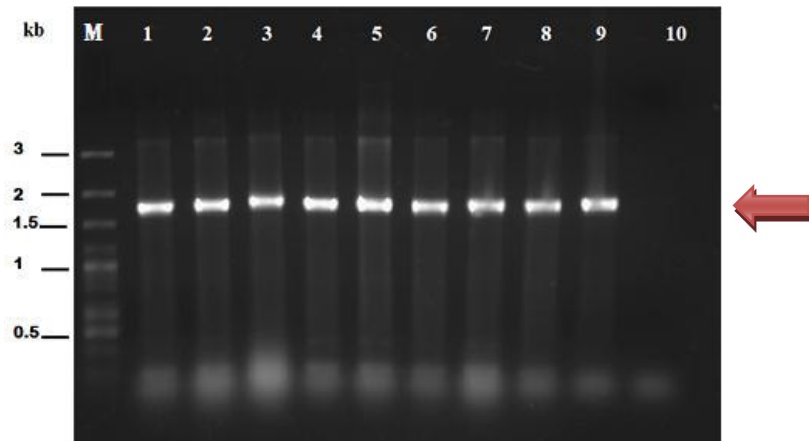


FIGURA 21. PCR de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS– rLptD. Carriles: (L) marcador de peso molecular Gene ruler 100 pb Plus ADN Ladder (ThermoScientific), (1-8) amplificados del gen lptD del carril 1 al 4 corresponde a clones de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS– rLptD-clona 3 y del carril 5 al 6 corresponde a clones de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS– rLptD-clona 5. (9) Control positivo, amplificado del gen lptD de *B. bacilliformis* cepa HBB4. (10) Control negativo. La flecha indica la altura del gen lptD amplificado (1 756 pb).

6.9. Expresión y purificación parcial de LptD recombinante

La curva de IPTG mostró que la expresión de LptD recombinante requiere una mínima concentración de 0.5 mM de IPTG, se evidencia que si aumentamos la concentración de IPTG (1, 1.5 o 2 mM) la expresión no varía de forma significativa (banda inducida son de semejante tamaño), a concentraciones menores de 0.5 mM se muestran bandas inducidas muy tenues, por otro lado, cuando la muestra es incubada sin IPTG (control negativo) no se evidencia banda inducida (**Figura 22**).

La expresión de la proteína se observa a las 7 y 16 horas de inducción, notamos que 4 horas fue insuficiente ya que se evidencia una banda de inducción muy tenue a la altura de 66 kDa y 24 horas fueron demasiadas provocando posiblemente la degradación de la proteína y ello hace que la banda de inducción se visualice tenue. Se escogió trabajar con 16 horas porque la banda inducida es más notoria que a las 7 horas. En cuanto a los medios de inducción, solo el medio TB logró ser el adecuado, tanto el medio LB y 2XYT no permiten la adecuada expresión de la proteína recombinante, ello se afirma porque en el gel de PAGE-SDS no se visualiza ninguna banda inducida (**Figura 23**).

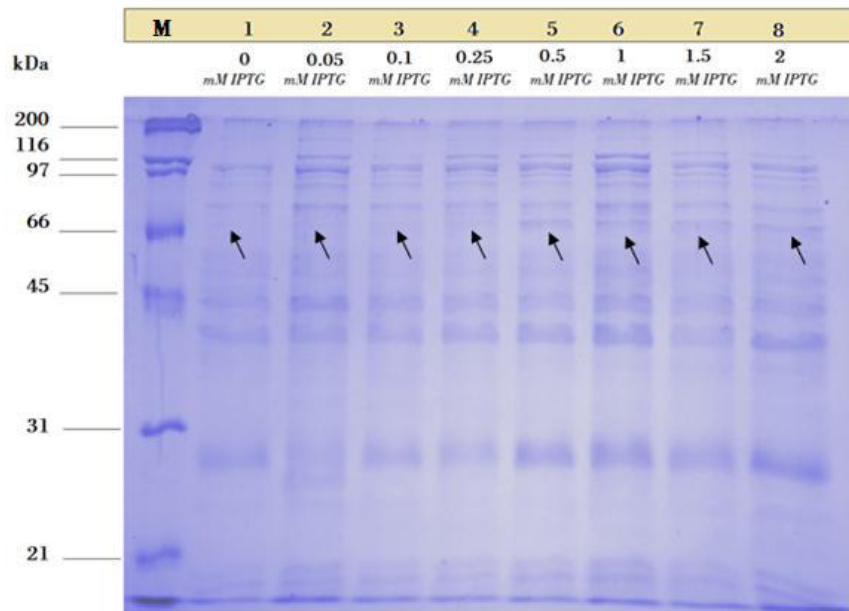


FIGURA 22. Inducción a diferentes concentraciones de IPTG. A la izquierda M (Marcador): Unstained Protein Standards). (1). 0 mM IPTG Control, (2) 0.05 mM IPTG, (3) 0.1 mM IPTG, (4) 0.25mM IPTG, (5) 0.5 mM IPTG, (6) 1 mM IPTG, (7) 1.5 mM IPTG, (8) 2 mM IPTG. Las flechas indican la altura de la proteína recombinante LptD (67.42 kDa) (banda inducida).

La optimización de la temperatura de inducción mostró que 28 °C es el valor más adecuado, a la temperatura de 20 °C la banda inducida es más delgada que a 28 °C, y a la temperatura de 37 °C no se visualiza banda inducida (**Figura 24**).

La inducción agregando 3 % de etanol con medio TB, a 28 °C, por 16 horas, en medio TB y con 0.5 mM IPTG resultó ser la más óptima en comparación si se agrega 1% o 2 % de etanol (**Figura 25**).

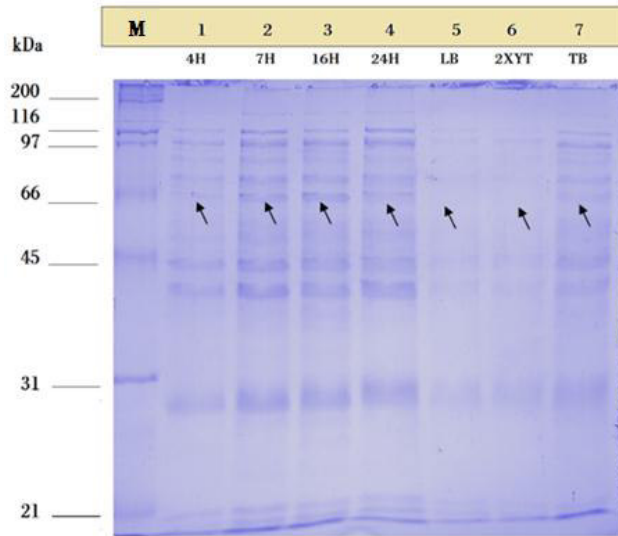


FIGURA 23. Inducción a diferentes tiempos y medios de cultivo. A la izquierda: (M) Marcador. Tiempos (1) 4 horas, (2) 7 horas, (3) 16 horas, (4) 24 horas, Medios (5) LB, (6) 2XYT, (7) TB. Las flechas indican la altura de la proteína recombinante LptD (67.42 kDa) (banda inducida).

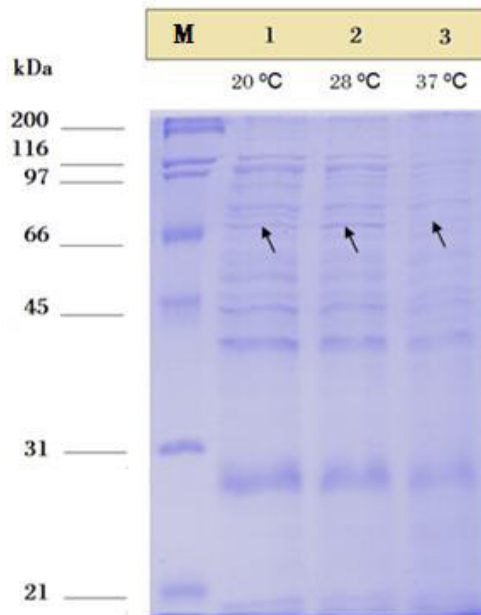


FIGURA 24. Inducción a diferentes temperaturas. A la izquierda: M (Marcador: Unstained Protein Standards). (1) 20 °C, (2) 28 °C, (3) 30 °C. Flechas indican la altura de la proteína recombinante LptD (67.42 kDa) (banda inducida).

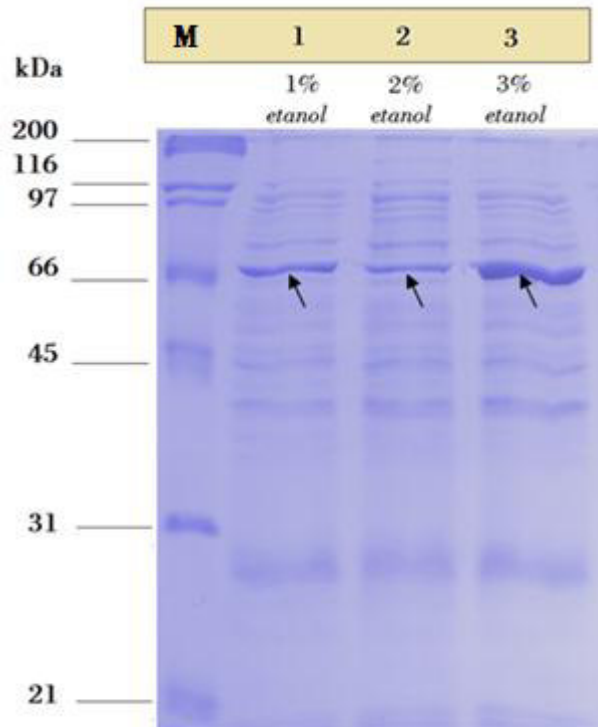


FIGURA 25. Inducción a diferentes concentraciones de etanol. A la izquierda: M (Marcador: Unstained Protein Standards). **(1)** 1% de etanol, **(2)** 2 % de etanol, **(3)** 3 % de etanol. Flechas indican la altura de la proteína recombinante LptD (67.42 kDa).

Las condiciones optimizadas para la inducción de la proteína LptD recombinante fueron: 0.5 mM IPTG, medio TB, 16 horas de inducción, 3% de etanol, 28 °C, todo el proceso llevado en agitación 200 r.p.m. Durante el proceso de optimización de la expresión las muestras fueron lisadas solo con buffer denaturante y observamos que en todos los casos existe gran cantidad de contaminantes (bandas inespecíficas) (**Figura 21 - 24**), agregando un paso más en la lisis permitió una purificación con menos contaminantes (pocas bandas inespecíficas), se encontró que es conveniente primero lisar con 100 µL de buffer no denaturante y luego lisar con 200 µL de buffer denaturante, al lisar con buffer no denaturante nos libramos de proteínas nativas existentes en la muestra que puedan interactuar con la resina en el momento de la purificación (**Figura 26**).

La purificación parcial de la proteína fue en condiciones denaturantes, ya que cuando se realizó en condiciones no denaturantes no se observó banda inducida (**Figura 26**).

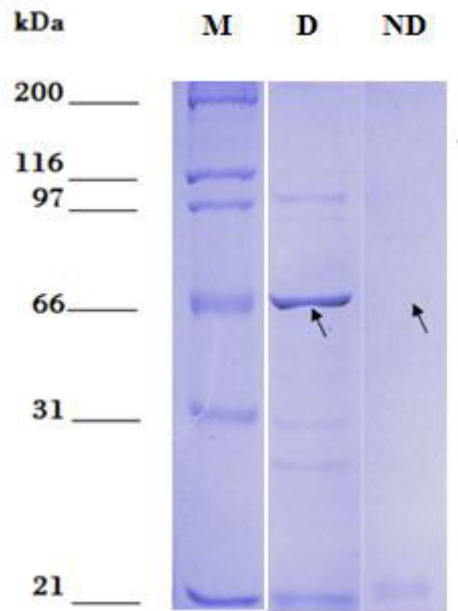


FIGURA 26. Purificación parcial de la proteína recombinante LptD condiciones denaturantes y no denaturantes. M (Marcador: Unstained Protein Standards). D: purificación parcial bajo condiciones denaturantes. ND: purificación parcial bajo condiciones no denaturantes. Flechas indican la altura de la proteína recombinante LptD (67.42 kDa).

El proceso de optimización evidenció que cuando se induce en condiciones óptimas, pero sin etanol la banda de purificación es mucho menor que cuando las condiciones óptimas incluyen al etanol, con ello podemos decir que el etanol es un factor importante en el proceso de inducción. También se evaluó una inducción en condiciones óptimas, pero sin IPTG, con el fin de evaluar si el etanol por si solo era capaz de inducir la expresión de LptD, se obtuvo que el etanol sin presencia de IPTG fue incapaz de lograr la expresión de la proteína (no se evidenció banda inducida).

La cantidad de proteína parcialmente purificada en condiciones óptimas medidas mediante el método de Bradford fue de 2.6 μg por 1 mL de cultivo bacteriano inducido (OD_{600} : entre 1 - 1.5).

6.10. Western Blot

El ensayo de western blot permitió evidenciar una reacción positiva (banda oscura y gruesa) entre la proteína recombinante LptD y los sueros de pacientes que sufrieron la enfermedad de Carrion, para este ensayo se utilizó 345 ng de proteína LptD recombinante parcialmente purificada, se realizó a la par una electroforesis con 115 ng de proteína LptD recombinante parcialmente purificada a modo de control (**Figura 27**).

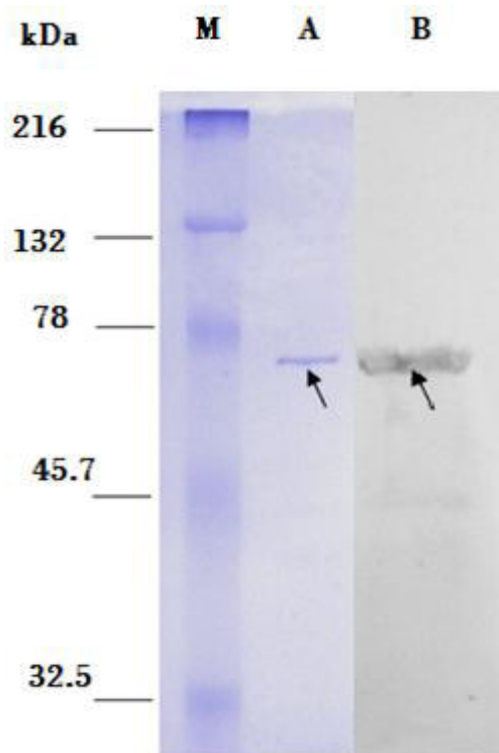


FIGURA 27. Western Blot. M (Marcador: Prestained Natural SDS-PAGE Protein Standards). **Lado izquierdo:** Gel de PAGE-SDS. **(A)** 115 ng de Proteína LptD parcialmente purificada (indicado con la flecha). **Lado derecho:** Membrana de nitrocelulosa. **(B)** Reacción positiva del Western Blot (indicado con la flecha).

7. DISCUSIÓN

Bartonella bacilliformis es una bacteria gram negativa en la que se ha reportado resistencia a antibióticos como rifampicina y eritromicina (Biswas *et al.*, 2007), y se ha observado *in vitro* que cuando se ha sido sometida a la presión de cloranfenicol y ciprofloxacina llega a presentar resistencias a éstas (Gomes *et al.*, 2016), en general se observa un incremento de resistencias a antibióticos por parte de las bacterias, ante ello se ha incrementado los estudios relacionados a la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos y candidatos vacunales, para lograr ambos objetivos diversas investigaciones están centrado su atención en las proteínas de membrana externa (OMP, de sus siglas en inglés outer membrane protein) por sus características intrínsecas (Li *et al.*, 2008 , Wang *et al.*, 2012). La enfermedad de Carrión no cuenta con una vacuna, una de las causas es el difícil cultivo de *B. bacilliformis*, aunque existen diversos protocolos para su cultivo (Birtles *et al.*, 2002; Angelakis *et al.*, 2008, Bisws *et al.*, 2007; Callison *et al.*, 2005; Battiiti y Minnick, 1999) como el empleado por nosotros (protocolo del Instituto Nacional de Salud, Ventura *et al.*, 2006) su crecimiento es lento (4 semanas), escaso y se emplea medios muy enriquecidos que incrementan el costo de su cultivo, por ello realizar una vacuna a partir de *B. bacilliformis* entera muerta o atenuada en vivo no es escalable. Por otro lado, la tecnología de vacunología reversa se muestra atractiva de ser usada en microorganismos de difícil cultivo además que nos permite realizar análisis *in silico* que nos ayudan a escoger al mejor candidato, por ello hemos empleado esta metodología. Otra causa es la dificultad intrínseca de estudio que posee *B. bacilliformis*, al ser una bacteria intracelular facultativa ha desarrollado mecanismos adaptativos que la conllevan a la evasión inmunitaria, ello representa un punto clave en el proceso de investigación sobre candidatos vacunales. Además, las investigaciones sobre candidatos vacunales contra la enfermedad de Carrión recién se han empezado a desarrollar.

7.1. Análisis *in silico*

La proteína LptD de *B. bacilliformis* fue la escogida para este estudio por presentar alta probabilidad de ser antigénica, estar localizado en la membrana externa, no presentar similitud con proteínas humanas, de ratón o de cerdo, tener un peso molecular mayor a 10 kDa y no ser una proteína utilizada en otro estudio, esto último fue la razón por la cual la proteína TonB no fuera escogida a pesar de reunir los primeros requisitos e incluso poseer una mayor probabilidad de ser antigénica que LptD (**Tabla 11**). A partir de estudios realizados en bacterias gram negativas podemos inferir la función de LptD de *B. bacilliformis*, así tenemos que es una OMP parte del sistema de transporte de lipopolisacáridos (LPS) LptABCDEFG, cuya función es llevar a cabo la translocación final de los LPS hacia la membrana externa (Braun *et al.*, 2002; Villa *et al.*, 2013, Botos *et al.*, 2017) (**Figura 28**). Cabe mencionar que la función de cada componente del transportador LptABCDEFG es esencial y actualmente son blanco de estudios relacionados al desarrollo de nuevos fármacos contra bacterias multiresistentes (Botos *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2014) y precisamente LptD de *Vibrio parahaemolyticus* ha mostrado ser altamente inmunogénica, en consecuencia, un buen candidato vacunal, además lo proponen a ser utilizado en inmunoterapia por ser pieza clave en el proceso final de translocación de LPS (Zha *et al.*, 2016).

LpTD de *B. bacilliformis* y LpTD de *V. parahaemolyticus* pertenecen a una misma familia de proteínas (PF04453), por ende, presentan características comunes, se espera que LpTD de *B. bacilliformis* pueda inducir una respuesta inmune en el huésped al igual que lo hace su homólogo, por el momento con los resultados obtenidos se puede afirmar que LpTD de *B. bacilliformis* es antigénica más faltaría realizar ensayos con animales de experimentación para afirmar que sea inmunogénica.

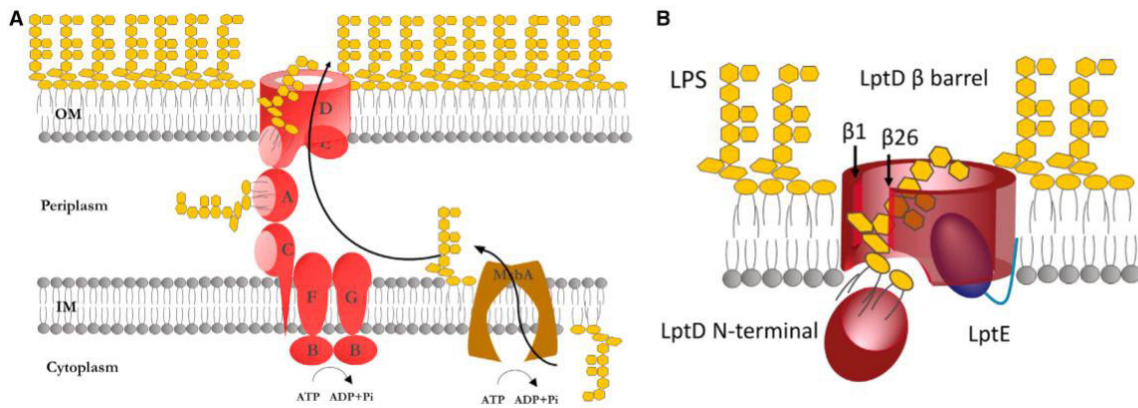


FIGURA 28. Sistema de transporte de LPS en bacterias gram negativas. (A) El transportador ABC y MsbA translocan al LPS a través de la membrana interna. Luego la maquinaria molecular de Lpt (LptA-G) transporta al LPS a través del periplasma y lo inserta en la membrana externa (OM) a expensas de la hidrólisis del ATP. Durante el transporte, la porción lipídica (lípidos A) se protege en la cavidad hidrófoba formada por las estructuras de b-jellyroll de LptC y LptA, mientras que la porción de polisacárido de LPS se expone al periplasma. Una vez que el LPS alcanza al complejo de LptDE en el OM, su porción de polisacárido se inserta en el lumen hidrofílico de LptD, mientras que el lípidos A se retiene en la cavidad del b-jellyroll del dominio N-terminal de LptD. **(B)** Estructura de LptD y LptE las Pro231 y 246 de las láminas $\beta 1$ y $\beta 26$ y permiten la apertura lateral de LptD y el transporte final de LPS a la superficie. (Fuente: Sperandeo y Polissi, 2016)

El modelo 3D de LptD de *B. bacilliformis* presenta una estructura mixta resaltando el alto porcentaje de láminas beta (52 %), lo que numéricamente representa a 26 láminas beta, esto le permite tener una estructura rígida, estable y formar un canal, la estructura modelada va acorde con su función prevista de transportador de lipopolisacáridos. Las OMP suelen presentar entre 8 – 26 láminas beta (Kleanthous *et al.*, 2015), en consecuencia LptD de *B. bacilliformis* se incluye dentro del grupo proteínas tipo barril de

gran tamaño. La estructura tipo barril bilobular con el dominio N- terminal periplasmático y C-terminal en la membrana externa de LptD de *B. bacilliformis*, han sido reportada en las estructuras cristalinas de *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ello evidencia que LptD es una proteína conservada en bacterias gram negativas (Botos *et al.*, 2016, Qiao *et al.*, 2014, Dong *et al.*, 2014). Mediante la base de datos PDB se observó una alta identidad de LpTD de *B. bacilliformis* con proteínas LpTD de otras especies, así tenemos un 30% de identidad con LpTD de *Pseudomonas aeruginosa*, 25 % de identidad con LpTD de *Klebsiella pneumoniae*, 28% de identidad con *Yersinia pestis*, y 21% de identidad con LpTD de *E. coli*. Al ser LpTD de *B. bacilliformis* una proteína conservada presentará también estabilidad genética, eso hace muy probable encontrar estructuras y propiedades muy similares en diferentes cepas de *Bartonella bacilliformis*, en ese aspecto una posible vacuna de LptD aportaría un amplio grado de protección. Aunque existe importantes hallazgos en relación a la estructura-función de la proteína LptD en diferentes especies, las propiedades antigénicas e inmunogénicas no han sido esclarecidas, por ende, este estudio proporciona la primera evidencia que la proteína LptD de *B. bacilliformis* es antigénica a través de análisis bioinformáticos y por Western Blot.

En el presente trabajo se decidió analizar solo el dominio extracelular de LptD de *B. bacilliformis* por dos razones: por ser la porción de LptD que es accesible a las células del sistema inmune del huésped; y porque el trabajo de Botos (2016) evidenció que el truncamiento de la porción N terminal no afecta al correcto plegamiento del barril beta de LptD en diferentes especies (*Y. pestis*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*) cuando son expresadas en *E. coli* , además menciona que el truncamiento permitió un aumento significativo en la coexpresión de la proteína LptD y LpTE, lo cual es uno de los objetivos que se busca alcanzar durante la expresión de proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos en el modelamiento *in silico* nos demuestran que el truncamiento N terminal de

LptD de *B. bacilliformis* no afectó su normal plegamiento, ello no se corroboró experimentalmente, pero si se demostró mediante western blot que los epítopes antigénicos se mantienen cuando son expresados en *E. coli BL21 (DE3) plySs*.

7.2. Expresión y antigenicidad de LptD recombinante

El clonamiento del gen LptD de *B. bacilliformis* y el proceso de transformación fue corroborado a través de PCR colonia y secuenciamiento. Los PCR colonia mostraron una única banda a la altura de 1.5 – 2 kb lo cual va acorde al tamaño del gen LpTD que expresa el dominio extracelular (1 756 pb), a excepción de la *E. coli* TOP10 – rLptD-clona 1 que logró amplificar varias bandas inespecíficas de tamaños mayores y menores a 1 756 pb (**Figura 17**), se puede deber a que el fragmento no fue clonado de manera adecuada produciendo cambios en el tamaño del gen, dicha clona no fue escogida para los posteriores ensayos.

El secuenciamiento nos permitió corroborar que el 80. 68% de los nucleótidos del gen clonado no sufrieron cambios nucleotídicos, a pesar que no se logró secuenciar la totalidad de los nucleótidos, podemos mencionar que el gen clonado en el plásmido pET28a(+) presentó una alta estabilidad hasta su transformación en *E. coli BL21 (DE3) plySs*.

Los ensayos de optimización de expresión de la proteína recombinante LptD buscó encontrar las condiciones necesarias para producir una alta concentración de proteína, ello con la finalidad de seguir realizando experimentos de caracterización, funcionalidad, inmunización en animales de experimentación, para lo cual es necesario producir en el orden de los miligramos. La expresión de la proteína LptD se realizó en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS por ser una cepa que da buenos resultados en la expresión de proteínas recombinantes (Studier *et al.*, 1986, Daegelen *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2017), por ser deficiente de la proteasa Lon (citoplasma) y OmpT (membrana externa), ello nos

permitiría minimizar la degradación de la proteína LptD, otra característica importante de la cepa es su baja producción de acetato ante altos niveles de glucosa, el acetato disminuye el crecimiento de las bacterias (Ahmad *et al.*, 2017), nuestros resultados corroboran lo mencionado, ya que cuando inducimos con el medio LB notamos que el crecimiento era más lento que con un medio muy enriquecido como lo es TB, se puede afirmar que el medio TB ayuda al rápido crecimiento de las bacterias por poseer altos niveles de glucosa que a la par inhibe la producción de acetato. Por otro lado, se menciona que los componentes del medio TB contribuyen a disminuir la expresión basal de la proteína recombinante (gracias a su alto contenido de glucosa) ello es vital cuando la proteína es tóxica para el hospedero de expresión, es preciso evitar la expresión basal debido a que una vez expresada la proteína se encontrará vulnerable también a ser degradada, en contraparte la expresión en grandes cantidades puede propiciar la formación de cuerpos de inclusión, una ventaja de ello es que se ha reportado que los cuerpos de inclusión son menos propensos a ser degradados por las enzimas (Upadhyay *et al.*, 2012). Notamos que 28 °C fue la temperatura de inducción óptima, a la temperatura de 37 °C no existió banda inducida, a partir de ello podemos considerar a 37 °C como una temperatura alta que afecta la estabilidad de la proteína inducida y/o acelera su degradación. Generalmente la inducción con IPTG iniciada en la fase logarítmica media del crecimiento bacteriano favorece la síntesis de la proteína recombinante (Ahmad *et al.*, 2018), se sigue la lógica que al tener una biomasa más grande existen más bacterias expresando la proteína recombinante, en el caso del uso de medio TB se da cuando el OD₆₀₀ está en el intervalo 1 -1.5 (Chhetri *et al.*, 2015) dicho rango se utilizó en las inducciones de nuestro experimento y nos dio buenos resultados. Generalmente, las proteínas de membrana se expresan en niveles bajos, (Bernaudat *et al.*, 2011), lo cual representa de por sí una desventaja, pero existen muchas herramientas para mejorar la expresión de proteínas recombinantes, como cambios en el codón,

vectores, hospederos, parámetros de cultivo, coexpresión con otros genes, expresión *in vitro* (Babu *et al.*, 2018; von Kamp and Klamt 2017; Yang *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2014) las desventajas de estos tratamientos recae en su elevado costo, mayor cantidad de ensayos, además muchas veces no logran los resultados en la medida esperada. En el 2015, Chhetri y colaboradores propusieron un protocolo simple y pionero para mejorar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* con promotores de expresión del tipo T5 (pQE) o T7 (pET), sus resultados muestran que agregando etanol a concentraciones ≤ 3 % (v/v) logran aumentar significativamente la expresión de múltiples proteínas recombinantes poco expresadas o no expresadas (MEX67, RPB5, RPB8, RPB11 de *Saccharomyces cerevisiae*, proteína de fusión péptido amiloide-beta (péptido A β -42) y glutaminil-ARNt sintetasa (GlnRS) de *Fasciola gigantica*, todas fueron inducidas con 1 mM IPTG y en medios con etanol al 3%), cabe mencionar que concentraciones de etanol ≤ 3 % no suponen condiciones desfavorables de crecimiento para *E. coli* (Chhetri *et al.*, 2015b; Yu *et al.*, 2016). En este estudio, el gen LptD de *B. bacilliformis* fue clonado en un plásmido pET 28a(+) con promotor de expresión T7 y expresado en *E. coli* BL21DE3plySs, con ello cumple los requisitos del tipo de cepa y promotor del protocolo de Chhetri. Ante la pobre expresión de LptD se optó por agregar 3 % de etanol al medio de cultivo en el momento de la inducción con IPTG, lo cual, logró un cambio significativo en la expresión, incluso agregando etanol al 1% y 2% se observó aumento en la expresión pero con la concentración de 3 % fue óptima, estable y repetitiva. Cada vez más trabajos muestran el efecto favorecedor del uso de etanol en el proceso de expresión de proteínas recombinantes, por ejemplo Zheng (2018) logró sobreexpresar una catalasa, pectasa y amilasa heteróloga en *E. coli* BL21 (pET26b-katA) al inducirla con 0.1 mM IPTG más 2 % de etanol, Indriawati (2018) logró expresar sin diferencias significativas la proteína Jemb en *E. coli* NICO (pBT7-C-His) utilizando etanol o IPTG y ambos al mismo tiempo, en nuestro caso fue lo contrario a los resultados de Indriawati, la

inducción sin IPTG no logró mostrar banda inducida en ninguna condición (con o sin etanol en el medio de cultivo), con ello podemos afirmar que al utilizar etanol e IPTG en la inducción de LptD recombinante de *B. bacilliformis* logran un efecto sinérgico, pero el etanol es incapaz de inducir la proteína LptD por sí solo. Existen varias hipótesis respecto a los mecanismos llevados a cabo por el etanol en el proceso de sobreexpresión de proteínas recombinantes, se menciona que el etanol es una molécula anfipática y que ello puede afectar el entorno celular provocando cambios en la fluidez de la membrana, transporte de membrana, composición de lípidos de membrana, ensamblaje de proteínas de membrana (Ingram *et al.*, 1984, Dombek *et al.*, 1984, Ingram *et al.*, 1986, Chen *et al.*, 1987, Enequist *et al.*, 1981) , así como mejorar la síntesis de ADN (Basu *et al.*, 1994). Recientemente, Zheng (2018) afirma que el etanol causa principalmente un impacto en el metabolismo celular y respuestas a stress celular, en consecuencia, el efecto del etanol en la expresión de proteínas heterólogas es muy complejo. El stress celular provoca un incremento de chaperonas, lo cual puede favorecer al plegamiento de las proteínas heterólogas y el impacto en el metabolismo celular trae consigo el aumento del metabolismo del propanoato y del ciclo de Krebs, ello indirectamente incrementaría la entrada de nutrientes a la célula provocando un efecto anabólico favoreciendo la expresión de proteínas heterólogas.

Las proteínas de membrana externa así como las proteínas con abundantes láminas beta en su estructura favorecen la formación de cuerpos de inclusión (Almad *et al.*, 2017; Ignatova *et al.*, 2007 Carrio *et al.*, 2005; Przybycien *et al.*, 1994; Oberg *et al.*, 1994), ellas pueden ser las causas que impidieron poder purificar la proteína LptD en condiciones no denaturantes, aunque este resultado contradice al hallado *in silico* donde se obtuvo que LptD era predominantemente hidrofílico, en consecuencia debió ser una proteína soluble. Cabe mencionar que los resultados hallados *in silico* pueden diferir de los experimentales. LptD al ser una proteína de membrana presenta una porción hidrofóbica insertada en la

membrana externa, dicha porción podría propiciar su conglomeración y formación de cuerpos de inclusión.

Las condiciones óptimas de inducción y purificación de la proteína LptD recombinante de *B. bacilliformis* nos han permitido evaluar su capacidad antigénica. A pesar que la purificación fue en condiciones denaturantes, la proteína recombinante fue capaz de reaccionar con el suero de pacientes humanos, ello nos corrobora que LptD posee múltiples epítopes lineales que son capaces de reaccionar, en cuanto a los epítopes conformacionales es muy probable hayan perdido su estructura 3D por la alta concentración de úrea (8M) usada en el proceso de purificación. El siguiente paso sería comprobar si la proteína purificada en condiciones denaturantes es capaz de producir una respuesta inmune en animales de experimentación.

La proteína LptD muestra *in silico* múltiples epítopes lineales y conformacionales expuestos al entorno extracelular, los tamaños van desde 6 hasta 207 residuos, la presencia de epítopes es característica de los antígenos. El programa ToxinPred nos evidenció que LptD no presenta toxicidad luego de evaluar 516 péptidos de su estructura, este programa basa sus resultados en la comparación de sus secuencias de aminoácidos de los péptidos de la proteína a evaluar con péptidos tóxicos de diferentes organismos. La importancia de no ser tóxica para el ser humano recae que no será perjudicial su utilización en ensayos tanto preclínicos como clínicos, así como su utilización en una vacuna. Existe una correlación entre antigenicidad, accesibilidad a solvente y flexibilidad de la proteína (Novotny et al., 1986), LpTD cumple con la correlación propuesta por Novotny por ser una proteína de membrana externa que presenta accesibilidad a solventes y presentar antígenos, en cuanto a la flexibilidad de la proteína menciona que estructuras menos flexibles de una proteína suelen ser antigénicas, LptD presenta una estructura rígida (26 láminas beta) ello puede ser una de las razones por las cuales presenta gran cantidad de epítopes.

B. bacilliformis es una bacteria intracelular facultativa, ello permite al hospedero dar una respuesta inmune celular y humoral. Los resultados del análisis bioinformático nos muestran que LpTD presenta múltiples péptidos que poseen unión fuerte con los HLA tipo I y II más frecuentes de la población peruana, dichos péptidos deben ser presentados a los linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ y provocar la activación de la respuesta inmune celular. Gracias al resultado positivo del western blot podemos afirmar que LptD nativa de *B. bacilliformis* es capaz de activar la respuesta inmunitaria humoral del huésped, el cual produce anticuerpos anti – LptD, ellos están presentes en los sueros de personas que sufrieron la enfermedad de Carrión y fueron reconocidos por la proteína recombinante LptD de *B. bacilliformis* en el ensayo de western blot. Para confirmar que LptD recombinante de *B. bacilliformis* es inmunogénico, es preciso realizar ensayos en animales de experimentación, mas la inmunogenicidad de esta proteína ya quedó comprobada.

8. CONCLUSIONES

- El análisis *in silico* determinó que el dominio extracelular de la proteína LptD de *B. bacilliformis* es antigénica que presenta epítopes que podrían ser reconocidos por alelos de HLA-I y HLA-II de la población peruana, por tanto esta proteína presenta potencial para ser considerada candidata vacunal contra la enfermedad de Carrión.
- Se clonó el gen parcial de LptD en pET28a(+) utilizando el vector de clonamiento *E. coli* TOP10 seguido del vector de expresión *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.
- Las condiciones óptimas de expresión del dominio extracelular de la proteína LptD recombinante de *B. bacilliformis* a pequeña escala son: medio TB, 16 horas, OD₆₀₀: 1-1.5, etanol al 3% (v/v), 0.5 mM IPTG y agitación (200 r.p.m.), además se demuestra que existe sinergia entre el IPTG y el etanol en el proceso de inducción. Con respecto a la purificación, LptD solo pudo ser obtenida de manera parcial en condiciones denaturantes empleando úrea 8M.
- El ensayo de Western Blot permitió corroborar la antigenicidad del dominio extracelular de la proteína LptD recombinante de *B. bacilliformis*.

9. RECOMENDACIONES

- Optimizar la expresión y purificación en masa del dominio extracelular de la proteína LptD recombinante.
- Realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* con el dominio extracelular de la proteína LptD recombinante purificada tales como, el ensayo *in vitro* de la inhibición de la invasión de eritrocitos por *Bartonella bacilliformis* e inmunizaciones a animales de experimentación (ratones de cepa Swiss y conejos de la raza New Zealand) con la proteína recombinante LptD seguido de una inoculación con *Bartonella bacilliformis* con el fin de evaluar su efecto inmunoprotector de la proteína recombinante.
- Evaluar mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* si los anticuerpos contra el dominio extracelular de la proteína LptD recombinante son capaces de disminuir el crecimiento de *Bartonella bacilliformis*, así evaluar su posible uso en inmunoterapia.

10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

AHMAD, I.; NAWAZ, N.; DARWESH, N.M.; UR RAHMAN, S.; MUSTAFA, M.Z.; KHAN, S.B. and PATCHING, S.G. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2018, vol. 144, p.12-18.

ANDRE, R.; KORVES, C.; FERNANDEZ, R.; CARBAJAL, F.; LAUGHLIN, L.; and WATTS, D. Host 'Feeding behavior of *Lutzomyia verrucarum* and around the house of bartonellosis patients in Perú. *In Program and abstracts of the 47th annual meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Am J Trop Med Hyg*. 1998, p. 212.

ANGKASEKWINAI, N.; ATKINS, E.H; ROMERO, S.; GRIECO; J.; CHAO, C. C. and CHING, W. M. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004, vol. 90, n° 4, p. 690-696.

AONO, R., NEGISHI, T., AIBE, K., INOUE, A. and HORIKOSHI, K., 1994. Mapping of organic solvent tolerance gene *ostA* in *Escherichia coli* K-12. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1994, vol 58, n° 7, p.1231-1235.

ARIEL, N.; ZVI, A.; GROSFELD, H.; GAT, O.; INBAR, Y.; VELAN, B. and SHAFFERMAN, A. Search for potential vaccine candidate open reading frames in the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO1: *in silico* and *in vitro* screening. *Infection and immunity*. 2002, vol. 70, n° 12, p. 6817-6827.

BABU, M.; BUNDALOVIC-TORMA, C.; CALMETTES, C.; PHANSE, S.; ZHANG, Q.; JIANG, Y.; MINIC, Z.; KIM, S.; MEHLA, J.; GAGARINOVA, A. and RODIONOVA, I. Global landscape of cell envelope protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*. 2018, vol 36, n° 1, p. 103.

BRADFORD, MARION. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, vol 72 (1-2), p 248-254.

BASU, T. and PODDAR, R.K. Effect of ethanol on *Escherichia coli* cells. Enhancement of ADN synthesis due to ethanol treatment. *Folia microbiologica*. 1994, vol 39, n° 1, p.3-6.

BATTISTI, J. M. and MINNICK, M. F. Development of a System for Genetic Manipulation of *Bartonella bacilliformis*. *Applied and environmental microbiology*. 1999, vol. 65, n° 8, p. 3441-3448.

BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J. and SAYERS, E. W. GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), 2012, D36-D42.

BENSON, L. A.; KAR, S. I. D. D. H. A. R. T. H. A.; MC LAUGHLIN, G. and IHLER, G. M. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infection and immunity*. 1986, vol. 54, n° 2, p. 347-353.

BERNAUDAT, F.; FRELET-BARRAND, A.; POCHON, N.; DEMENTIN, S.; HIVIN, P.; BOUTIGNY, S.; RIOUX, J.B.; SALVI, D.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; RICHAUD, P. and JOYARD, J. Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PloS one*. 2011, vol 6, n° 12, p.e29191.

BETTS, Joanna C. Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. *IUBMB life*. 2002, vol. 53, n° 4-5, p. 239-242.

BIMBOIM, H. and JO, Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid ADN. *Nucleic acids research*. 1979, vol. 7, n° 6, p. 1513-1523.

BORNHORST, Joshua A. and FALKE, Joseph J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*. Academic Press. 2000. p. 245-254.

BOTOS, I.; Majdalani N.; Mayclin, S. J.; McCarthy, J. G.; Lundquist, K.; Wojtowicz, D.; Barnard T. J.; Gumbart; J. C. and Buchanan, S. K. Structural and functional characterization of the LPS transporter LptDE from Gram-negative pathogens. *Structure*. 2016, vol. 24, n° 6, p. 965-976.

BOTOS, I.; MAJDALANI, N.; MAYCLIN, S.J.; MCCARTHY, J.G.; LUNDQUIST, K.; WOJTOWICZ, D.; BARNARD, T.J.; GUMBART, J.C. and BUCHANAN, S.K. Structural and functional characterization of the LPS transporter LptDE from Gram-negative pathogens. *Structure*. 2016, vol 24, n° 6, p.965-976.

BUI H. H.; SIDNEY J.; DINH K.; SOUTHWOOD S.; NEWMAN M. J. AND SETTE A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC bioinformatics*. 2006, vol. 7, n° 1, p. 153.

CAPO, Sabrina; NUTI, S.; SCARSELLI, M.; TAVARINI, S.; MONTIGIANI, S.; MORI, E. and BENSI, G. *Chlamydia pneumoniae* genome sequence analysis and identification of HLA-A2-restricted CD8+ T cell epitopes recognized by infection - primed T cells. *Vaccine*. 2005, vol. 23, n° 42, p. 5028-5037.

CARRIO M.; GONZALEZ-MONTALBAN N.; VERA A.; VILLAVERDE A. and VENTURA S. Propiedades similares a las amiloides de cuerpos de inclusión bacterianos. *J Mol Biol*. 2005; vol 347, p 1025-1037.

CHALONER, G.L.; VENTOSILLA, P. and BIRTLES, R.J. Multi-locus sequence analysis reveals profound genetic diversity among isolates of the human pathogen *Bartonella bacilliformis*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011, vol 5, n° 7, p.e1248.

CHEN, L.I.N.G.L.I.N.G. and TAI, P.C. Effects of antibiotics and other inhibitors on ATP-dependent protein translocation into membrane vesicles. *Journal of bacteriology*. 1987, vol 169, n° 6, p.2373-2379.

CHHETRI, G.; KALITA, P. and TRIPATHI, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, 2015, vol 2, p.385-391.

COLEMAN, Sherry A. and MINNICK, Michael F. Differential expression of the invasion-associated locus B (ialB) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues. *Microbial pathogenesis*. 2003, vol. 34, n° 4, p. 179-186.

DABER, R.; STAYROOK, S.; ROSENBERG, A. and LEWIS, M. Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors. *Journal of molecular biology*. 2007, vol. 370, n° 4, p. 609-619.

DAEGELEN, P.; STUDIER, F.W.; LENSKI, R.E.; CURE, S. and KIM, J.F. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of molecular biology*. 2009, vol 394, n° 4, p.634-643.

DEL GIUDICE, G. and RAPPUOLI, R. Molecular approaches for safer and stronger vaccines. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*.1999, vol. 129, n° 46, p.1744-1748.

DELANY, Isabel; RAPPUOLI, Rino and SEIB, Kate L. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013, vol. 3, n° 5, p. a012476.

DELIDOW, B. C.; LYNCH, J.P.;PELUSO, J.J. and WHITE, B.A. Polymerase chain reaction, en "Basic ADN and RNA protocols". *Editado por Harwood, A. J., Humana Press Inc., NJ, USA*. 1996, p. 275-92

DOMBEK, K.M. and INGRAM, L.O. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *Journal of bacteriology*. 1984, vol 157, n° 1, p.233-239.

DOYTCHINOVA, I. A., and FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics*. 2007, vol. 8, n° 1, p. 4.

ENEQUIST, H.G., HIRST, T.R., HARAYAMA, S., HARDY, S.J. and RANDALL, L.L. Energy is required for maturation of exported proteins in *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry*. 1981, vol 116, n° 2, p.227-233.

ETZ, H.; MINH, D. B.; HENICS, T.; DRYLA, A.; WINKLER, B.; TRISKA, C. and BUSCHLE, M. Identification of *in vivo* expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, vol. 99, n° 10, p. 6573-6578.

FERREIRA, Joilyne y PORCO, Antonietta. Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacunología inversa. *Interciencia*. 2008, vol. 33, n° 5, p. 353-358.

GALLEGOS, K., BALDEVIANO, C., MARCELO, A., y PADILLA, C. Clonamiento, expresión y seroreactividad del antígeno recombinante flagelina de *Bartonella bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2005, vol. 22, n° 1, p. 39-46.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. E.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D., and BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Humana Press*. 2005, p. 571-607.

GOMES, C.; PALMA, N.; PONS, M. J.; MAGALLÓN-TEJADA, A., SANDOVAL, I., TINCO-VALDEZ, C., GUTARRA, C., DEL VALLE-MENDOZA, J., RUIZ, J. and MATSUOKA, M. Succinyl-CoA Synthetase: New Antigen Candidate of *Bartonella bacilliformis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016, vol. 10, n° 9, p. e0004989.

GUPTA, Sudheer. *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS One*. 2013, vol. 8, n° 9, p. e73957.

HANAHAN, D., JESSEE, J. and BLOOM, F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *In Methods in enzymology*. Academic Press. 1991, vol. 204, p. 63-113.

HE, Yongqun; XIANG, Zuoshuang; MOBLEY and Harry LT. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *BioMed Research International*. 2010, vol. 2010.

HENRIQUEZ-CAMACHO, C.; VENTOSILLA, P.; MINNICK, M. F.; RUIZ, J. and MAGUIÑA, C. Proteins of *Bartonella bacilliformis*: candidates for vaccine development. *International journal of peptides*. 2015.

IGNATOVA Z.; KRISHNAN B.; BOMBARDIER J.P.; MARCELINO A.M. and HONG J. Del tubo de ensayo a la célula: explorando el plegamiento y la agregación de una proteína β Clam. *Biopolimeros*. 2007, vol 88, p 157–163.

INGRAM, L.O. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends in Biotechnology*. 1986, vol 4, n° 2, p.40-44.

INGRAM, L.O.N. and BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on micro-organisms. *In Advances in microbial physiology Academic press*. 1985, vol. 25, p. 253-300.

ISH-HOROWICZ, D. and BURKE, J.F. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research*. 1981, vol 9, n° 13, p.2989-2898.

IWAKI-EGAWA, S., and IHLER, G. M. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. *FEMS microbiology letters*. 1997, vol. 157, n° 1, p. 207-217.

JENSEN, K K, Andreatta, M., Marcatili, P., Buus, S., Greenbaum, J. A., Yan, Z., y Nielsen, M. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*, 2018.

JURTZ, V.; SINU, P.; MASSIMO, A.; MARCATILI, P.; PETERS, B. and NIELSEN, M . NetMHCpan-4.0: Improved peptide–MHC class I interaction predictions integrating eluted ligand and peptide binding affinity data. *The Journal of Immunology*. 2017, p. j11700893.

KAISER, P. O.; RIESS, T.; O'ROURKE, F.; LINKE, D. and KEMPF, V. A. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011, vol 301, n° 1, p. 7-15.

KÄLLBERG, M.; WANG, H.; WANG, S.; PENG, J.; WANG, Z.; LU, H. and XU, J. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature protocols*. 2012, vol. 7, n° 8, p. 1511-1522.

KIM, S.; JEONG, H.; KIM, E.Y.; KIM, J.F.; LEE, S.Y. and YOON, S.H. Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Nucleic acids research*. 2017, vol 45, n° 9, p.5285-5293.

KLEANTHOUS, C.; RASSAM, P. and BAUMANN, C.G. Protein–protein interactions and the spatiotemporal dynamics of bacterial outer membrane proteins. *Current opinion in structural biology*. 2015, vol 35, p.109-115.

KNOBLOCH, J. Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1988, vol. 39, n° 2, p. 173-178.

LEVINE, MYRON M. and LAGOS, ROSANNA. Vaccines and vaccination in historical perspective. *New generation vaccines*. 1990, vol. 2, p. 1-11.

LONG, Carole A.; HOFFMAN, Stephen L. Malaria--from Infants to Genomics to Vaccines. *Science*. 2002, vol. 297, n° 5580, p. 345-347.

LÓPEZ-HOYOS, M. G.; FERNÁNDEZ-FRESNEDO, H.; LÓPEZ-ESCRIBANO, y A. L. M. DE FRANCISCO. Antigenicidad de las proteínas recombinantes. *Gaceta Médica de Bilbao*. 2004, vol 101, n° 1, p. 17-21.

LOVELL, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., y Richardson, D. C. Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2003, vol. 50, no. 3, pp. 437-450.

MAO, Z., YU, L., YOU, Z., WEI, Y., and LIU, Y. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish y shellfish immunology*. 2007, vol. 23, n° 3, p. 567-575.

MASIGNANI, Vega; RAPPUOLI, Rino and PIZZA, Mariagrazia. Reverse vaccinology: a genome-based approach for vaccine development. *Expert opinion on biological therapy*, 2002, vol. 2, n° 8, p. 895-905.

MINISTERIO DE SALUD [en línea]. Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Metaxénicas, 2008[fecha de consulta: 10 de enero de 2019]. Disponible en http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_contentyview=article&id=613&Itemid=397.

MINISTERIO DE SALUD, Norma técnica para la atención de la Bartonelosis o enfermedad de Carrión en el Perú. Ministerio de Salud (MINSA), Lima, 2006.

MINNICK, M. F.; ANDERSON, B. E.; LIMA, A.; BATTISTI J. M.; LAWYER, P. G. and BIRTLES, R. J. Oroya fever and verruga peruana: bartonellosis unique to South America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014, vol. 8, n° 7, p. e2919.

MINNICK, M.F. Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*. *Infection and immunity*. 1994, vol 62, n° 6, p.2644-2648.

MINSA, Perú. Enfermedades metaxénicas y otras. [Actualizada en 2010]; [acceso 28 enero del 2017]. Disponible en: www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=5

MURRAY, Vincent. Improved double-stranded ADN sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*. 1989, vol. 17, n° 21, p. 8889.

NOGUCHI, Hideyo and BATTISTINI, Telémaco S. Etiology of oroya fever: Cultivation of *Bartonella bacilliformis*. *Journal of Experimental Medicine*. 1926, vol. 43, n° 6, p. 851-864.

OBERG K.; Chrnyk B.A.; Wetzel R. and Fink A.L. Estructura secundaria de tipo nativo en cuerpos de inclusión de interleucina-1 β por reflectancia total atenuada FTIR. *Bioquímica*. 1994; vol 3, p 2628–2634.

PACHAS, P. Epidemiología de la bartonellosis en el Perú: *Módulos Técnicos-Serie Documentos Monográficos*. 2000.

PADILLA, C.; GALLEGOS, K.; MARCELO, A.; CHENET, S. y BALDEVIANO, C. Expresión y serorreactividad de la lipoproteína recombinante de 43-kda de *Bartonella bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2006, vol. 23, n° 3, pp.182-187.

PADMALAYAM, I.; ANDERSON, B.; KRON, M.; KELLY, T. and BAUMSTARK, B. The 75-kilodalton antigen of *Bartonella bacilliformis* is a structural homolog of the cell division protein FtsZ. *Journal of bacteriology*. 1997, vol. 179, n° 14, p. 4545-4552.

PÉREZ-REYTOR, Dilia Celeste y SOSA ESPINOSA, Angela Estela. Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. *Vaccimonitor*. 2010, vol. 19, n° 2, p. 11-17.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G., y NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature method*. 2011, vol. 8, n° 10, p. 785-786.

PONOMARENKO, J.; BUI, H. H.; LI, W.; FUSSEDER, N.; BOURNE, P. E.; SETTE, A., y PETERS, B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC bioinformatics*. 2008, vol. 9, n° 1, p. 514.

PRZYBYCIEN T.M.; DUNN J.P.; VALAX P. y GEORGIU G. Caracterización de la estructura secundaria de cuerpos de inclusión de β -lactamasa. *Protein Eng*. 1994, vol 7, p 131-136.

QIAO, S.; LUO, Q.; ZHAO, Y.; ZHANG, X.C. and HUANG, Y. Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. *Nature*. 2014, vol 511, n° 7507, p.108.

RAPPUOLI, R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. *Vaccine*. 2001a, vol.19, n° 17, p. 2319-2322.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 2001b, vol. 19, n° 17, p. 2688-2691.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*, 2000, vol. 3, n° 5, p. 445-450.

RIESS, T.; ANDERSSON, S. G.; LUPAS, A.; SCHALLER, M.; SCHÄFER, A.; KYME, P.; MARTIN, J.; WÄLZLEIN, J.; EHEHALT, U.; LINDROOS, H. and SCHIRLE, M. *Bartonella adhesin a* mediates a proangiogenic host cell response. *Journal of Experimental Medicine*. 2004, vol. 200, n° 10, p. 1267-1278.

ROSS, B. C.; CZAJKOWSKI, L.; HOCKING, D.; MARGETTS, M.; WEBB, E.; ROTHEL, L.; PATTERSON M.; AGIUS, C.; CAMUGLIA, S.; REYNOLDS, E. and LITTLEJOHN, T. Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of *Porphyromonas gingivalis*. *Vaccine*. 2001, vol 19, n° 30, p. 4135-4142.

SAMPSON, B.A.; MISRA, R. and BENSON, S.A. Identification and characterization of a new gene of *Escherichia coli* K-12 involved in outer membrane permeability. *Genetics*. 1989, vol 122, n° 3, p. 491-501.

SANGER, F.; NICKLEN, S. and COULSON, A.R. ADN sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1977, vol. 74, n° 12, p. 5463-5467.

SCHERER, D. C.; DEBURON-CONNORS, I. and MINNICK, M. F. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of antflagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infection and immunity*. 1993, vol. 61, n° 12, p. 4962-4971.

SEIB, KATE L.; ZHAO, XIN and RAPPUOLI, RINO. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical microbiology and infection*. 2012, vol. 18, p. 109-116.

SOLANO, V. y SOLANO, L. La enfermedad de Carrión y la biología de *Bartonella bacilliformis*. *Rev. peru. med. Trop*. 1991, vol. 5, p. 8-13.

SPERANDEO, Paola and POLISSI, Alessandra. Lipopolysaccharide transport to the cell surface: new insights in assembly into the outer membrane. *Structure*. 2016, vol. 24, n° 6, p. 847-849.

STUDIER, F.W. and MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 1986, vol 189, n° 1, p.113-130.

UPADHYAY, A.K.; MURMU, A.; SINGH, A. and PANDA, A.K. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2012, vol 7, n° 3, p.e33951.

VENTURA EGÚSQUIZA, Gladys y PADILLA ROJAS, Carlos P. Diagnóstico bacteriológico de la Bartonelosis humana o enfermedad de Carrión. Repositorio científico del Instituto Nacional de Salud. 2006.

VILLA, R., MARTORANA, A.M., OKUDA, S., GOURLAY, L.J., NARDINI, M., SPERANDEO, P., DEHÒ, G., BOLOGNESI, M., KAHNE, D. and POLISSI, A. The *Escherichia coli* Lpt transenvelope protein complex for lipopolysaccharide export is assembled via conserved structurally homologous domains. *Journal of bacteriology*. 2013, p.JB-02057.

VON KAMP, Axel, and STEFFEN Klamt. Growth-coupled overproduction is feasible for almost all metabolites in five major production organisms. *Nature communications*, 2017, vol 8, p. 15956.

WACK, A. and RAPPUOLI, R. Vaccinology at the beginning of the 21st century. *Current opinion in immunology*. 2005, vol. 17, n° 4, p. 411-418.

WANG, C.; LIU, Y.; LI, H.; XU, W. J.; ZHANG, H. and PENG, X. X. Identification of plasma-responsive outer membrane proteins and their vaccine potential in *Edwardsiella tarda* using proteomic approach. *Journal of proteomics*. 2012, vol. 75, n° 4, p. 1263-1275.

WIZEMANN, Theresa M.; HEINRICHS, J. H.; ADAMOU, J. E.; Erwin, A. L.; KUNSCH, C.; CHOI, G. H., and GAYLE, A. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*. 2001, vol. 69, n° 3, p. 1593-1598.

YANG, J.; ZONG, Y.; SU, J.; LI, H.; ZHU, H.; COLUMBUS, L.; ZHOU, L. and LIU, Q. Conformation transitions of the polypeptide-binding pocket support an active substrate release from Hsp70s. *Nature communications*. 2017, vol 8, n° 1, p.1201.

YU, Z.; ZHENG, H.; ZHAO, X.; LI, S.; XU, J. and SONG, H. 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. *Bioresource technology*. 2016, vol 214, p.303-310.

ZHA, Z.; LI, C.; LI, W.; YE, Z. and PAN, J. LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Scientific reports*. 2016, vol. 6, p. 38577.

ZHENG, H.; YU, Z.; SHU, W.; FU, X.; ZHAO, X.; YANG, S.; TAN, M.; XU, J.; LIU, Y. and SONG, H. Ethanol effects on the overexpression of heterologous catalase in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Applied microbiology and biotechnology*. 2018, p.1-13.

ZORRILLA, V.; VÁSQUEZ, G.; ESPADA, L. and RAMÍREZ, P. Vectores de la leishmaniasis tegumentaria y la Enfermedad de Carrión en el Perú: una actualización. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2017, vol 34, p.485-496.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo para equilibrar la resina His60 Ni Superflow (Clontech):

- Tomar 32 μL de resina, centrifugar a 1000 g por 1 min y eliminar el sobrenadante.
- Lavar la resina con 250 μL de buffer de lisis nativo, centrifugar a 1 000 g por 1 min y eliminar el buffer.
- Agregar 34 μL de buffer de lisis denaturante o nativo (depende del tratamiento que llevemos a cabo), ello hace un volumen final de 50 μL .

ANEXO B.1

1. Secuencia nucleotídica del gen lptD:

>Gen_LptD

```
atgagtcaaaaaataatTTTAAAAAaagtaattagctTAAAAAGCGTtatcagctttatTTAaattTaaGctTggctttatctgttctgtaag
agcgcaaaatcctgctccatTTTtCacaataacaccgaaaactcaaaaaatcctctttactctccgctgatgaactatttacaacatgatat
aaatactgtttccgcacaaagaaatgtccaaatcgaatatgatggcaacaaagtaccgcacaaagcgtcacttataatcaaaaaacagg
acgtattatagcccaaggaaatgtgaaattattcaaaaaatggcaataaaatctactccaatcagattgatatgaccgaagactttggTga
aggTTtatcaattctttacgtattgaaacagctaacaatatacatttcgagctgccaatgctcaacgtagctccctcaataacaatttcaa
caatgctacatacagcttGtaaccttGctacgataagcAAatagagaaacctTgtggaaaatcaaggcaaaaaaaatcatatggaat
aatgcatcaaaacaattcggTTgaagatgctcattTgaaattTtgTataccggTataaaaattccagTtttgagctaccggaccagctga
aaaacgTgctagTggTtactcacacctcactTTTTacgctaatacattTggctTggcataaaaaactcttattTctggaattTgcccctcattatg
atTTtcaactgctggaactTTTatacgaacaagggctTTtaaccgaaggtgaatggcgtcaacattTaaacgggtatttatagatccgctt
cgctcatatatacAAaactaatcctcataactcGaaaataaacactgtTgatgcacaaaataccaatcgttatatgatggcaacaaaaggTg
atTTtctgtaataattcagcgtggacctacggctgggatactctgcacagtcagaccacattTtagccgtgcatacaaaattgaaacctatagt
aacctctgacaaactctcagctttattgaaaggcttaccaggtaaaaattactttgatacacgTTTTaccattTcaaatccaagactcaatgTt
aataatccctttatgaaaaccatttcaacaagcatgggttctccctgcattgattattcttgacaccagaggaaccagtttatgctgggga
acttaccTTtaacagtaatatgcaatcaattatcgtagccatgctgctggctttaatgatactgattggcaaaattccccacttaatatcactcaa
ctttccggaattgctggaaaaagtttctgTTtaacaggtgaactagaatggaaaaagcgtTTtaacacgcaaaatgggttcataataatcccta
ctctgcttacgcgcgatacaatcgaatcaatgctcatgaaaactataatgctcatacattaaatagctcttcaacaaagTTtaattgTgctt
catcagctgctatccgtagcatggcaacaataggtttagaattacgttatcccttcttataacttctgaaatttctacacatatcttagaaccaac
agtacaagttttatcgcgaataacgaacaccatgttggacaattccctaataagatgcaaaagtttTgTtTgactcaaccactttatttca
acgcgataaaatttctggatatgatcgtgtagagggaacaagagccaatataggttgagatattctggaaatcttagcaagaattgTc
atTTtatagcttGtcggacaatcttccatctcgcaggaaagaattctttgcagaacgagaccctattaacacaggtTTTtattctgTgcatTgaa
acagcacgttcagactatgTcgccatgtTggTgtaaacaccagacaatggTTTTctgtagaatctcgcggacgtTTtaaaaaataaacaggTaa
aatTcgccgtaatgaaatagaagcatcacaaaaatggTcaaatctTggatagcaacacaatatacttatatccaaaaataaccagattacg
aatatacacaagaccgccaagaaattctTTTcaaaactggTgTaaattatcaacaattggTctatcaataacaatgttagctatgatttagctc
cagaaaaattgTaaacaaggaataaaatttaagctacatagatgaatgctTtggaaataacattcggTtatcaacaaataacaaatcctgTgTga
aaaagcacctTgaaaaattTaatTTTcttctccttgcgcacaattgcagattcggTcaaaaaataaaactcaattTataa
```

2. Secuencia aminoacídica de la proteína LptD:

>Secuencia_aminoacídica_LpTD

```
MSQKILKKLSILALKSVISFILLSLALSCSVRAQNPAPFFHNNTENSKNPLLLSADELIYNHDINTVSA
QGNVQIEYDGNKVTAQSVTYNQKTGRIIAQGNVEIIQKNGNKIYSNQIDMTEDFGEGFINSLRIETAN
NIHFAANAQRSLPQITIFNNATYTACQPCYDKPNRETLWKIKAKKIWNVVIKTIRFEDAHFEIFGIPVI
KFPVFELPDPAEKRVSGLLTPHFFYANHLGFGIKNSYFWNLSPHYDFTLSGTFYTKQGLLTEGEWR
QHFKTGIYSIRFAHIYQTNPHNFENNTVDAQNTNRYMMATKGDfrINSRWTYGWDIFAQSDPHFSR
AYKIETYSNPVQTSQLYLNGLTGKNYFDTRFYHFQIQDSMFNNPFHENHSQQAWVLPRIDYFLTPE
EPVYAGELTFNSNMQSIYRSHAAGFNDTDWQNSPLNITQLSGIAGKSFRLTGELEWKKRFNTQNG
FIIPTLALRADTIAINAHENYNAHTLNSSTKFNVAASSAIRSMATIGLELRYPLITSEISTHILEPTVQ
VFIRNNEHHVQFPNEDAQSFFVDSTTLFQRDKFSGYDRVEGGTRANIGLRYSGNLSKNWSFYSL
VGQSFHLGKNSFAERDPINTGFYSGIETARSDYVAMFGVNHDNGFSVESRGRFNKITGKIRRNEI
EASQKWSNLWIATQYTYIQNPDYEYTDQRQEISFQTGVKLSNNWSINNNVSYDLVSRKFVKQGIN
LSYIDECFGITFGYQQITNPGEKAPLKNFNFSLSLRTIADFGQKIKLNL
```

ANEXO B.2

Secuencia nucleotídica del gen LptD que codifica el dominio extracelular

```
>atggtaccggaccagctgaaaaacgtgctcagtggttactcacacctcacttttttacgctaatacatcttggttggcataaaaaactcttat
ttctggaattgtcccctcattatgatttacactgtctggaacttttatacgaacaagggtcttaaccgaaggatggtgcaacattttaa
aacgggtattatagatccgcttcgctcatatatacacaactaactcctacataactcgaataaacactggtgatgcacaaaataccaatcgtt
atatgatggcaacaaaagggtgatttctgattatcagctggacctacggctgggatctctgcacagtcagaccacattttagccgtgc
atacaaaattgaaacctatagtaaccctgtacaaaactctcagcttattgaaagggtcttacaggtaaaaatacttggatacacggtttaccatt
tcaaatccaagactcaatgtttaataatcccttcatgaaaaccattctcaacaagcatgggttctccctcgcattgattttctgacaccaga
ggaaccagttttagctggggaacttaccttaacagtaaatgcaatcaattatcgtagccatgctgctggcttaatgatactgattggcaaaa
tccccacttaatacactcaacttccggaattgctggaaaaagtttctgtaaacagggtgaactagaatggaaaaagcgtttaaaccgcaa
aatgggtcataataatccctactctgcttacgcccatacaatcgcaatcaatgctcatgaaaactataatgctcatacattaaatagctc
tcaacaaagtttaattgctcctcagctgctatccgtagcatggcaacaataggtttagaattacggtatcccttctataactctgaaattct
acacatacttagaaccaacagtacaagttttatcgaataacgaacacacatggtggacaattccctaatgaagatgcacaaagtttgggt
ttgactcaaccactttattcaacgataaatttctggatgatcgtgtagaggaggaaacaagagccaataggttggatattctgga
aatcttagcaagaattggcattttatagccttgcggacaactttccatctcgcaggaaagaattctttgcagaacgagaccctattaacaca
ggtttttctggcattgaaacagcagctcagactatgctccatggttggtaaacacagcaatggtttctgtagaatctcgcggacgtt
taataaaataacaggtaaaattcgcgtaataagaatagaagcatcacaataatggtaaatcttggatagcaacacatacttataatcc
aaaatcaaccagattacgaatatacacaagaccgccaagaaattctttcaactgggttaaattatctaacaattggctatcaataacaa
tgtagctatgatttagtctccagaaaattgtaaaacaaggaataaatttaagctacatagatgaatgcttggataacattcgggtatcaaca
aatacaaatctggtgaaaaagcaccttgaaaaatttattttcttctccttgcgcacaattgcagatttcggtcaaaaaataaaactcaa
tttactcgagcaccaccaccaccactga
```

Secuencia aminoacídica del dominio extracelular de la proteína LptD

```
>MVPDPAEKRVSGLLTPHFFYANHLGFGIKNSYFWNLSPHYDFTLSGTFYTKQGLLTEGE
WRQHFKTGIYSIRFAHIYQTNPHNFENNTVDAQNTNRYMMATKGDFRINSRWTYGWDIF
AQSDPHFSRAYKIETYSNPVQTSQLYLNLGTGKNYFDTRFYHFQIQDSMFNPFHENHS
QQAWVLPRIDYFLTPEEPVYAGELTFNSNMQSIYRSHAAGFNDDWQNSPLNITQLSGIA
GKSFRLTGELEWKKRFNTQNGFIIPTLALRADTIAINAHENYNAHTLNSSTKFNVASSAAI
RSMATIGLELRYPLITSEISTHILEPTVQVFIRNNEHHVGGQFPNEDAQS FVFDSTTLFQRD
KFSGYDRVEGGTRANIGLRYSGNLSKNWSFYSLVGQSFHLAGKNSFAERDPINTGFYSGI
ETARSDYVAMFGVNHNDNGFSVESRGRFNKITGKIRRNEIEASQKWSNLWIATQYTYIQNQ
PDYEYTDQRQEISFQTGVKLSNNWSINNNVSYDLVSRKFVKQGINLSYIDECFGITFGYQQ
ITNPGEKAPLKNFNFSLSLRTIADFGQKIKLNLLEHHHHHH
```

ANEXO B.3

Secuencia nucleotídica del Amplicón clonado orf (1 756 pb)

catggTACCGGACCCAGCTGAAAAACGTGTCAGTGGTTTTACTCACACCTCACTTTTTTTACGCTAA
TCATCTTGGCTTTGGCATAAAAAACTCTTATTTCTGGAATTTGTCCCCTCATTATGATTTTACACT
GTCTGGAACTTTTTATACGAAACAAGGGCTTTTAACCGAAGGTGAATGGCGTCAACATTTTAAA
ACGGGTATTTATAGTATCCGCTTCGCTCATATATACCAAATAATCCTCATAACTTCGAAAATAA
CACTGTTGATGCACAAAATACCAATCGTTATATGATGGCAACAAAAGGTGATTTTCGTATTAATT
CACGCTGGACCTACGGCTGGGATATCTTCGCACAGTCAGACCCACATTTTAGCCGTGCATACA
AAATTGAAACCTATAGTAACCCTGTACAACTTCTCAGCTTTATTTGAACGGTCTTACAGGTAAA
AATTACTTTGATACACGTTTTTACCATTTTCAAATCCAAGACTCAATGTTTAATAATCCCTTTT
GAAAACCATTTCTCAACAAGCATGGGTTCTCCCTCGCATTGATTATTTCTTGACACCAGAGGAAC
CAGTTTATGCTGGGGAACCTTACCTTTAACAGTAATATGCAATCAATTTATCGTAGCCATGCTGCT
GGCTTTAATGATACTGATTGGCAAATTCCCACTTAATATCACTCAACTTTCCGGAATTGCTG
GAAAAAGTTTTCGTTTAAACAGGTGAACTAGAATGGAAAAAGCGTTTTAACACGCAAAAATGGGT
CATAATAATCCCTACTCTTGCCTTACGCGCCGATACAATCGCAATCAATGCTCATGAAAACAT
AATGCTCATAACATTAAGCTCTTCAACAAAGTTTAAATGTTGCCTCATCAGCTGCTATCCGTAG
CATGGCAACAATAGGTTTGAATTACGTTATCCCTTTCTTATAACTTCTGAAATTTCTACACATAT
CTTAGAACCAACAGTACAAGTTTTTATACGCAATAACGAACACCATGTTGGACAATTCCCTAAT
GAAGATGCACAAAGTTTTGTGTTTGACTCAACCACTTTATTTCAACGCGATAAATTTTCTGGATA
TGATCGTGTAGAGGGAGGAACAAGAGCCAATATAGGTTTGAGATATTCTGGAAATCTTAGCAA
GAATTGGTCATTTTATAGCCTTGTGCGACAATCTTTCCATCTCGCAGGAAAAGAATTCTTTT
GCA
GAACGAGACCCTATTAACACAGGTTTTTATTCTGGCATTGAAACAGCACGTTTACACTATGTGCG
CCATGTTTGGTGTAAACCACGACAATGGTTTTTCTGTAGAATCTCGCGGACGTTTTAATAAAATA
ACAGGTAATTCGCCGTAATGAAATAGAAGCATCACAAAAATGGTCAAATCTTTGGATAGCAA
CACAAATACTTATATCCAAAATCAACCAGATTACGAATATACACAAGACCGCCAAGAAATTTCT
TTCAAACCTGGTGTAAATTATCTAACAATTGGTCTATCAATAACAATGTTAGCTATGATTTAGTC
TCCAGAAAATTTGTAAAACAAGGAATAAATTTAAGCTACATAGATGAATGCTTTGGAATAACATT
CGGTTATCAACAAATAACAATCCTGGTGAAAAGCACCTTTGAAAATTTTAAATTTTCTCTTTC
CTTGCGCACAATTGCAGATTTCCGGTCAAAAATAAAACTCAATTTACTCGAGCACCACCACCAC
CACCCTGA

ANEXO C. Resultado de la evaluación de la toxicidad de 569 péptidos del dominio extracelular de LptD.

Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción	Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción	Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción
MVPDPAEKRV	-0.8	Non-Toxin	SIRFAHIYQT	-1.06	Non-Toxin	QTSQLYLNGL	-1.23	Non-Toxin
VPDPAEKRV	-0.9	Non-Toxin	IRFAHIYQTN	-1.01	Non-Toxin	TSQLYLNGLT	-1.4	Non-Toxin
PDPAEKRVSG	-0.9	Non-Toxin	RFAHIYQTNP	-0.91	Non-Toxin	SQLYLNGLTG	-1.26	Non-Toxin
DPAEKRVSG	-1.08	Non-Toxin	FAHIYQTNPH	-1.02	Non-Toxin	QLYLNGLTGK	-1.08	Non-Toxin
PAEKRVSGLL	-1.3	Non-Toxin	AHIYQTNPHN	-0.9	Non-Toxin	LYLNGLTGKN	-0.84	Non-Toxin
AEKRVSGLLT	-1.43	Non-Toxin	HIYQTNPHNF	-1.21	Non-Toxin	YLNGLTGKNY	-0.82	Non-Toxin
EKRVSGLLTP	-1.53	Non-Toxin	IYQTNPHNFE	-1.14	Non-Toxin	LNGLTGKNYF	-0.66	Non-Toxin
KRVSGLLTPH	-1.47	Non-Toxin	YQTNPHNFEN	-0.89	Non-Toxin	NGLTGKNYFD	-0.66	Non-Toxin
RVSGLLTPHF	-1.56	Non-Toxin	QTNPHNFENN	-1.03	Non-Toxin	GLTGKNYFDT	-0.73	Non-Toxin
VSGLLTPHFF	-1.28	Non-Toxin	TNPHNFENNT	-0.96	Non-Toxin	LTGKNYFDTR	-0.49	Non-Toxin
SGLLTPHFFY	-1.37	Non-Toxin	NPHNFENNTV	-0.88	Non-Toxin	TGKNYFDTRF	-0.43	Non-Toxin
GLLTPHFFYA	-1.47	Non-Toxin	PHNFENNTVD	-1.02	Non-Toxin	GKNYFDTRFY	-0.57	Non-Toxin
LLTPHFFYAN	-1.3	Non-Toxin	HNFENNTVDA	-0.97	Non-Toxin	KNYFDTRFYH	-0.69	Non-Toxin
LTPHFFYANH	-1.11	Non-Toxin	NFENNTVDAQ	-0.98	Non-Toxin	NYFDTRFYHF	-0.83	Non-Toxin
TPHFFYANHL	-0.9	Non-Toxin	FENNTVDAQN	-0.71	Non-Toxin	YFDTRFYHFQ	-1.03	Non-Toxin
PHFFYANHLG	-0.95	Non-Toxin	ENNTVDAQNT	-0.65	Non-Toxin	FDTRFYHFQI	-0.94	Non-Toxin
HFYANHLGFG	-0.84	Non-Toxin	NNTVDAQNTN	-0.63	Non-Toxin	DTRFYHFQIQ	-0.98	Non-Toxin
FFYANHLGFG	-0.81	Non-Toxin	NTVDAQNTNR	-0.63	Non-Toxin	TRFYHFQIQD	-1.38	Non-Toxin
FYANHLGFGI	-0.96	Non-Toxin	TVDAQNTNRY	-0.45	Non-Toxin	RFYHFQIQDS	-1.71	Non-Toxin
YANHLGFGIK	-0.85	Non-Toxin	VDAQNTNRYM	-0.52	Non-Toxin	FYHFQIQDSM	-1.64	Non-Toxin
ANHLGFGIKN	-0.76	Non-Toxin	DAQNTNRYMM	-0.49	Non-Toxin	YHFQIQDSMF	-1.47	Non-Toxin
NHLGFGIKNS	-0.76	Non-Toxin	AQNTNRYMMA	-0.64	Non-Toxin	HFQIQDSMFN	-1.45	Non-Toxin
HLGFGIKNSY	-0.93	Non-Toxin	QNTNRYMMAT	-0.71	Non-Toxin	FQIQDSMFNN	-1.33	Non-Toxin
LGFGIKNSYF	-1	Non-Toxin	NTNRYMMATK	-1.02	Non-Toxin	QIQDSMFNNP	-1	Non-Toxin
GFGIKNSYFW	-0.94	Non-Toxin	TNRYMMATKG	-0.93	Non-Toxin	IQDSMFNNPF	-1.13	Non-Toxin
FGIKNSYFWN	-1	Non-Toxin	NRYYMMATKGD	-0.84	Non-Toxin	QDSMFNNPFF	-0.77	Non-Toxin
GIKNSYFWNL	-0.79	Non-Toxin	RYMMATKGDG	-1.12	Non-Toxin	DSMFNNPFHE	-0.54	Non-Toxin
IKNSYFWNLS	-0.86	Non-Toxin	YMMATKGDGFR	-1.48	Non-Toxin	SMFNNPFHEN	-0.56	Non-Toxin
KNSYFWNLSL	-0.83	Non-Toxin	MMATKGDGFR	-1.65	Non-Toxin	MFNNPFHENH	-0.54	Non-Toxin
NSYFWNLSLPH	-0.96	Non-Toxin	MATKGDGFRIN	-1.61	Non-Toxin	FNNPFHENHS	-0.5	Non-Toxin
SYFWNLSLPHY	-1.1	Non-Toxin	ATKGDGFRINS	-1.32	Non-Toxin	NNPFHENHSQ	-0.56	Non-Toxin
YFWNLSLPHYD	-0.99	Non-Toxin	TKGDGFRINSR	-1.25	Non-Toxin	NPFHENHSQQ	-0.75	Non-Toxin
FWNLSLPHYDF	-1.16	Non-Toxin	KGDGFRINSRW	-0.99	Non-Toxin	PFHENHSQQA	-1.01	Non-Toxin
WNLSLPHYDFT	-1.13	Non-Toxin	GDFRINSRWT	-1.18	Non-Toxin	FHENHSQQAW	-0.8	Non-Toxin
NLSLPHYDFTL	-1.14	Non-Toxin	DFRINSRWTY	-1.17	Non-Toxin	HENHSQQAWV	-1.03	Non-Toxin
LSPHYDFTLS	-1.14	Non-Toxin	FRINSRWTYG	-1	Non-Toxin	ENHSQQAWVL	-1.11	Non-Toxin
SPHYDFTLSG	-1.2	Non-Toxin	RINSRWTYGW	-0.72	Non-Toxin	NHSQQAWVLP	-1.16	Non-Toxin
PHYDFTLSGT	-1.22	Non-Toxin	INSRWTYGWD	-0.31	Non-Toxin	HSQQAWVLPRI	-1.52	Non-Toxin
HYDFTLSGTG	-1.15	Non-Toxin	NSRWTYGWDI	-0.35	Non-Toxin	SQQAWVLPRI	-1.77	Non-Toxin
YDFTLSGTGY	-1.34	Non-Toxin	SRWTYGWDIF	-0.67	Non-Toxin	QQAQAWVLPRI	-1.63	Non-Toxin
DFTLSGTGYT	-1.5	Non-Toxin	RWTYGWDIFA	-0.81	Non-Toxin	QAQAWVLPRI	-1.45	Non-Toxin
FTLSGTGYTK	-1.64	Non-Toxin	WTYGWDIFAQ	-0.62	Non-Toxin	AWVLPRIQDY	-1.39	Non-Toxin
TLSGTGYTKQ	-1.49	Non-Toxin	TYGWDIFAQS	-0.51	Non-Toxin	WVLPRIQDYFL	-1.45	Non-Toxin
LSGTGYTKQG	-1.45	Non-Toxin	YGWDIFAQSD	-0.54	Non-Toxin	VLPRIDYFLT	-1.46	Non-Toxin
SGTGYTKQGL	-1.4	Non-Toxin	GWDIFAQSDP	-0.46	Non-Toxin	LPRIDYFLTP	-1.41	Non-Toxin
GFTYTKQGLL	-1.5	Non-Toxin	WDIFAQSDPH	-0.67	Non-Toxin	PRIDYFLTPE	-1.28	Non-Toxin
TFYTKQGLLT	-1.69	Non-Toxin	DIFAQSDPHF	-0.93	Non-Toxin	RIDYFLTPEE	-0.94	Non-Toxin
FYTKQGLLTE	-1.68	Non-Toxin	IFAQSDPHFS	-1.01	Non-Toxin	IDYFLTPEEP	-0.72	Non-Toxin
YTKQGLLTEG	-1.47	Non-Toxin	FAQSDPHFSR	-0.83	Non-Toxin	DYFLTPEEPV	-0.8	Non-Toxin
TKQGLLTEGE	-1.51	Non-Toxin	AQSDPHFSRA	-0.75	Non-Toxin	YFLTPEEPVY	-1.11	Non-Toxin
KQGLLTEGEW	-1.31	Non-Toxin	QSDPHFSRAY	-0.82	Non-Toxin	FLTPEEPVYA	-1.27	Non-Toxin
QGLLTEGEWR	-1.26	Non-Toxin	SDPHFSRAYK	-0.72	Non-Toxin	LTPPEPVYAG	-1.34	Non-Toxin
GLLTEGEWRQ	-1.15	Non-Toxin	DPHFSRAYKI	-0.9	Non-Toxin	TPEEPVYAGE	-1.34	Non-Toxin
LLTEGEWRQH	-1.09	Non-Toxin	PHFSRAYKIE	-0.99	Non-Toxin	PEEPVYAGEL	-1.39	Non-Toxin
LTEGEWRQHF	-1.09	Non-Toxin	HFSRAYKIET	-0.92	Non-Toxin	EPPVYAGELT	-1.36	Non-Toxin
TEGEWRQHFK	-1	Non-Toxin	FSRAYKIETY	-0.7	Non-Toxin	EPVYAGELTF	-1.65	Non-Toxin
EGEWRQHFKT	-0.83	Non-Toxin	SRAYKIETYS	-0.64	Non-Toxin	PVYAGELTFN	-1.6	Non-Toxin
GEWRQHFKTG	-0.91	Non-Toxin	RAYKIETYSN	-0.78	Non-Toxin	VYAGELTFNS	-1.3	Non-Toxin
EWQRHFKTGI	-0.9	Non-Toxin	AYKIETYSNP	-0.62	Non-Toxin	YAGELTFNSN	-1.17	Non-Toxin
WRQHFKTGIY	-1.15	Non-Toxin	YKIETYSNPV	-0.73	Non-Toxin	AGELTFNSNM	-0.94	Non-Toxin
RQHFKTGIYS	-1.3	Non-Toxin	KIETYSNPVQ	-0.93	Non-Toxin	GELTFNSNMQ	-1.33	Non-Toxin
QHFKTGIYSI	-1.51	Non-Toxin	IETYSNPVQT	-0.82	Non-Toxin	ELTFNSNMQS	-1.11	Non-Toxin
HFKTGIYSIR	-1.42	Non-Toxin	ETYSNPVQTS	-0.9	Non-Toxin	LTFSNSNMQSI	-1.07	Non-Toxin
FKTGIYSIRF	-1.35	Non-Toxin	TYSNPVQTSQ	-0.95	Non-Toxin	TFNSNMQSIY	-1.33	Non-Toxin
KTGIYSIRFAH	-1.35	Non-Toxin	YSNPVQTSQL	-1.24	Non-Toxin	FNSNMQSIYR	-1.29	Non-Toxin
TGIYSIRFAH	-1.3	Non-Toxin	SNPVQTSQLY	-1.13	Non-Toxin	NSNMQSIYRS	-1.13	Non-Toxin
GIYSIRFAHI	-1.4	Non-Toxin	NPVQTSQLYL	-1.17	Non-Toxin	SNMQSIYRSH	-1.37	Non-Toxin
IYSIRFAHIY	-1.49	Non-Toxin	PVQTSQLYLN	-1.49	Non-Toxin	NMQSIYRSHA	-1.39	Non-Toxin
YSIRFAHIYQ	-1.15	Non-Toxin	VQTSQLYLN	-1.35	Non-Toxin	MQSIYRSHAA	-1.55	Non-Toxin

Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción	Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción	Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción
QSIYRSHAAG	-1.36	Non-Toxin	HENYNAHTLN	-0.73	Non-Toxin	EDAQSFVFD5	-0.94	Non-Toxin
SIYRSHAAGF	-1.53	Non-Toxin	ENYNAHTLNS	-0.48	Non-Toxin	DAQSFVFDST	-0.96	Non-Toxin
IYRSHAAGFN	-1.42	Non-Toxin	NYNAHTLNSS	-0.39	Non-Toxin	AQSFVFDSTT	-0.86	Non-Toxin
YRSHAAGFND	-0.99	Non-Toxin	YNAHTLNSSS	-0.48	Non-Toxin	QSFVFDSTTL	-1.09	Non-Toxin
RSHAAGFNDD	-0.93	Non-Toxin	NAHTLNSSST	-0.53	Non-Toxin	SFVFDSTTLF	-1.17	Non-Toxin
SHAAGFNDDT	-0.98	Non-Toxin	AHTLNSSSTK	-0.74	Non-Toxin	FVFDSTTLFQ	-1.29	Non-Toxin
HAAGFNDDTW	-0.79	Non-Toxin	HTLNSSSTKF	-0.61	Non-Toxin	VFDSTTLFQR	-1.2	Non-Toxin
AAGFNDDTWQ	-0.8	Non-Toxin	TLNNSSTKFN	-0.83	Non-Toxin	FDSTTLFQRD	-1.24	Non-Toxin
AGFNDDTWQN	-0.71	Non-Toxin	LNSSTKFNV	-0.76	Non-Toxin	DSTTLFQRDK	-1	Non-Toxin
GFNDTDWQNS	-0.52	Non-Toxin	NSSTKFNVA	-0.66	Non-Toxin	STTLFQRDKF	-0.78	Non-Toxin
FNDTDWQNSP	-0.43	Non-Toxin	SSSTKFNVAS	-0.71	Non-Toxin	TTLFQRDKFS	-0.92	Non-Toxin
NDTDWQNSPL	-0.43	Non-Toxin	SSTKFNVA55	-0.71	Non-Toxin	TLFQRDKFSG	-1.03	Non-Toxin
DTDWQNSPLN	-0.57	Non-Toxin	STKFNVA55A	-0.77	Non-Toxin	LFQRDKFSGY	-0.74	Non-Toxin
TDWQNSPLNI	-0.76	Non-Toxin	TKFNVA55AA	-0.79	Non-Toxin	FQRDKFSGYD	-0.71	Non-Toxin
DWQNSPLNIT	-1	Non-Toxin	KFNVA55AAI	-0.54	Non-Toxin	QRDKFSGYDR	-0.73	Non-Toxin
WQNSPLNITQ	-1.35	Non-Toxin	FNVA55AAIR	-0.6	Non-Toxin	RDKFSGYDRV	-0.87	Non-Toxin
QNSPLNITQL	-1.56	Non-Toxin	NVA55AAIRS	-0.64	Non-Toxin	DKFSGYDRVE	-0.9	Non-Toxin
NSPLNITQLS	-1.6	Non-Toxin	VAA55AAIRSM	-0.56	Non-Toxin	KFSGYDRVEG	-0.92	Non-Toxin
SPLNITQLSG	-1.6	Non-Toxin	ASSAAIRSMMA	-0.63	Non-Toxin	FSGYDRVEGG	-1.17	Non-Toxin
PLNITQLSGI	-1.77	Non-Toxin	SSAAIRSMAT	-0.7	Non-Toxin	SGYDRVEGGT	-0.93	Non-Toxin
LNITQLSGIA	-1.78	Non-Toxin	SAAIRSMATI	-0.89	Non-Toxin	GYDRVEGGTR	-0.72	Non-Toxin
NITQLSGIAG	-1.7	Non-Toxin	AAIRSMATIG	-0.74	Non-Toxin	YDRVEGGTRA	-0.83	Non-Toxin
ITQLSGIAGK	-1.56	Non-Toxin	AIRSMATIGL	-0.58	Non-Toxin	DRVEGGTRAN	-0.81	Non-Toxin
TQLSGIAGKS	-1.31	Non-Toxin	IRSMATIGLE	-0.6	Non-Toxin	RVEGGTRANI	-0.7	Non-Toxin
QLSGIAGKSF	-1.09	Non-Toxin	RSMATIGLEL	-0.9	Non-Toxin	VEGGTRANIG	-0.48	Non-Toxin
LSGIAGK5FR	-1.17	Non-Toxin	SMATIGLELR	-1.04	Non-Toxin	EGGTRANIGL	-0.32	Non-Toxin
SGIAGK5FRL	-1.18	Non-Toxin	MATIGLELRY	-0.96	Non-Toxin	GGTRANIGLR	-0.36	Non-Toxin
GIAGK5FRLT	-1.21	Non-Toxin	ATIGLELRYP	-0.61	Non-Toxin	GTRANIGLRY	-0.32	Non-Toxin
IAGK5FRLTG	-1.15	Non-Toxin	TIGLELRYPF	-0.65	Non-Toxin	TRANIGLRYS	-0.51	Non-Toxin
AGK5FRLTGE	-1.3	Non-Toxin	IGLELRYPFL	-0.47	Non-Toxin	RANIGLRYSG	-0.76	Non-Toxin
GK5FRLTGEL	-1.43	Non-Toxin	GLELRYPFLI	-0.58	Non-Toxin	ANIGLRYSGN	-0.98	Non-Toxin
K5FRLTGELE	-1.5	Non-Toxin	LELRYPFLIT	-0.85	Non-Toxin	NIGLRYSGNL	-1.01	Non-Toxin
SFRLTGELEW	-1.55	Non-Toxin	ELRYPFLITS	-0.97	Non-Toxin	IGLRYSGNLS	-0.84	Non-Toxin
FRLTGELEWK	-1.45	Non-Toxin	LRYPFLITSE	-0.83	Non-Toxin	GLRYSGNLSK	-0.81	Non-Toxin
RLTGELEWKK	-1.37	Non-Toxin	RYPFLITSEI	-0.77	Non-Toxin	LRYSGNLSKN	-0.81	Non-Toxin
LTGELEWKKR	-1.25	Non-Toxin	YPFLITSEIS	-1.26	Non-Toxin	RYSGNLSKNW	-0.68	Non-Toxin
TGELEWKKRF	-1.16	Non-Toxin	PFLITSEIST	-1.53	Non-Toxin	YSGNLSKNWS	-0.99	Non-Toxin
GELEWKKRFN	-1.19	Non-Toxin	FLITSEISTH	-1.5	Non-Toxin	SGNLSKNWSF	-0.93	Non-Toxin
ELEWKKRFNT	-1.1	Non-Toxin	LITSEISTHI	-1.64	Non-Toxin	GNLSKNWSFY	-1.09	Non-Toxin
LEWKKRFNTQ	-1.25	Non-Toxin	ITSEISTHIL	-1.47	Non-Toxin	NLSKNWSFY5	-1.02	Non-Toxin
EWKKRFNTQN	-1.16	Non-Toxin	TSEISTHILE	-1.27	Non-Toxin	LSKNWSFY5L	-1.3	Non-Toxin
WKKRFNTQNG	-0.95	Non-Toxin	SEISTHILEP	-1.18	Non-Toxin	SKNWSFY5LV	-1.26	Non-Toxin
KKRFNTQNGF	-1.09	Non-Toxin	EISTHILEPT	-1.3	Non-Toxin	KNWSFY5LVG	-1.28	Non-Toxin
KRFNTQNGFI	-1.07	Non-Toxin	ISTHILEPTV	-1.33	Non-Toxin	NWSFY5LVGQ	-1.29	Non-Toxin
RFNTQNGFII	-0.98	Non-Toxin	STHILEPTVQ	-1.27	Non-Toxin	WSFY5LVGQS	-1.18	Non-Toxin
FNTQNGFIII	-0.79	Non-Toxin	THILEPTVQV	-1.36	Non-Toxin	SFY5LVGQSF	-1.08	Non-Toxin
NTQNGFIIIP	-0.67	Non-Toxin	HILEPTVQVF	-1.27	Non-Toxin	FY5LVGQSFH	-0.83	Non-Toxin
TQNGFIIIPT	-0.8	Non-Toxin	ILEPTVQVFI	-1.16	Non-Toxin	Y5LVGQSFHL	-0.63	Non-Toxin
QNGFIIPTL	-0.69	Non-Toxin	LEPTVQVFIR	-0.95	Non-Toxin	5LVGQSFHLA	-0.6	Non-Toxin
NGFIIPTLAL	-0.8	Non-Toxin	EPTVQVFIRN	-0.88	Non-Toxin	LVGQSFHLAG	-0.6	Non-Toxin
GFIIPTLAL	-0.58	Non-Toxin	PTVQVFIRNN	-0.86	Non-Toxin	VGQSFHLAGK	-0.5	Non-Toxin
FIIPTLALR	-0.73	Non-Toxin	TVQVFIRNNE	-0.7	Non-Toxin	GQSFHLAGKN	-0.48	Non-Toxin
IIPTLALRA	-0.7	Non-Toxin	VQVFIRNNEH	-0.48	Non-Toxin	QSFHLAGKNS	-0.41	Non-Toxin
IIPTLALRAD	-0.82	Non-Toxin	QVFIRNNEHH	-0.46	Non-Toxin	SFHLAGKNSF	-0.55	Non-Toxin
IPTLALRADT	-0.97	Non-Toxin	VFIRNNEHHV	-0.5	Non-Toxin	FHLAGKNSFA	-0.56	Non-Toxin
PTLALRADTI	-1.04	Non-Toxin	FIRNNEHHVHG	-0.59	Non-Toxin	HLAGKNSFAE	-0.65	Non-Toxin
TLALRADTIA	-0.89	Non-Toxin	IRNNEHHVHGQ	-0.61	Non-Toxin	LAGKNSFAER	-1.1	Non-Toxin
LALRADTIAI	-0.87	Non-Toxin	RNNEHHVHGQF	-0.61	Non-Toxin	AGKNSFAERD	-1.01	Non-Toxin
ALRADTIAIN	-0.69	Non-Toxin	NNEHHVHGQFP	-0.57	Non-Toxin	GKNSFAERDP	-0.87	Non-Toxin
LRADTIAINA	-0.56	Non-Toxin	NEHHVHGQFPN	-0.51	Non-Toxin	KNSFAERDPI	-1.1	Non-Toxin
RADTIAINAH	-0.39	Non-Toxin	EHHVHGQFPNE	-0.51	Non-Toxin	NSFAERDPIN	-1.16	Non-Toxin
ADTIAINAH	-0.5	Non-Toxin	HHVHGQFPNED	-0.7	Non-Toxin	SFAERDPINT	-1.27	Non-Toxin
DTIAINAHEN	-0.65	Non-Toxin	HVHGQFPNEDA	-0.7	Non-Toxin	FAERDPINTG	-1.26	Non-Toxin
TIINAHENY	-0.69	Non-Toxin	VHGQFPNEDAQ	-0.51	Non-Toxin	AERDPINTGF	-1.19	Non-Toxin
IINAHENYNY	-0.81	Non-Toxin	QGFPNEDAQ5	-0.25	Non-Toxin	ERDPINTGFY	-1.46	Non-Toxin
AINAHENYNA	-0.75	Non-Toxin	QFPNEDAQ5F	-0.33	Non-Toxin	RDPIINTGFYS	-1.12	Non-Toxin
INAHENYNAH	-0.62	Non-Toxin	FPNEDAQ5FV	-0.56	Non-Toxin	DPINTGFYSG	-1.08	Non-Toxin
NAHENYNAHT	-0.52	Non-Toxin	PNEDAQ5FVF	-0.7	Non-Toxin	PINTGFYSGI	-1.2	Non-Toxin
AHENYNAHTL	-0.61	Non-Toxin	NEDAQ5FVFD	-0.82	Non-Toxin	INTGFYSGIE	-1.02	Non-Toxin

Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción	Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción	Secuencia peptídica	Puntaje	Predicción
NTGFYSGIET	-1.09	Non-Toxin	KWSNLWIATQ	-0.41	Non-Toxin	INLSYIDECF	-0.24	Non-Toxin
TGFYSGIETA	-1.26	Non-Toxin	WSNLWIATQY	-0.61	Non-Toxin	NLSYIDECFG	-0.31	Non-Toxin
GFYSGIETAR	-1.45	Non-Toxin	SNLWIATQYT	-0.56	Non-Toxin	LSYIDECFGI	-0.41	Non-Toxin
FYSGIETARS	-1.38	Non-Toxin	NLWIATQYTY	-0.4	Non-Toxin	SYIDECFGIT	-0.53	Non-Toxin
YSGIETARSD	-1.18	Non-Toxin	LWIATQYTYI	-0.37	Non-Toxin	YIDECFGITF	-0.6	Non-Toxin
SGIETARSDY	-0.96	Non-Toxin	WIATQYTYIQ	-0.64	Non-Toxin	IDECFGITFG	-0.64	Non-Toxin
GIETARSDYV	-1.06	Non-Toxin	IATQYTYIQN	-0.98	Non-Toxin	DECFGITFGY	-0.62	Non-Toxin
IETARSDYVA	-1.09	Non-Toxin	ATQYTYIQNQ	-1.17	Non-Toxin	ECFGITFGYQ	-0.65	Non-Toxin
ETARSDYVAM	-1.06	Non-Toxin	PDYEYTDQRQ	-1.3	Non-Toxin	CFGITFGYQQ	-1.1	Non-Toxin
TARSDYVAMF	-0.99	Non-Toxin	DYEYTDQRQE	-1.27	Non-Toxin	FGITFGYQQI	-1.18	Non-Toxin
ARSDYVAMFG	-0.96	Non-Toxin	YEYTDQRQEI	-1.39	Non-Toxin	GITFGYQQIT	-1.31	Non-Toxin
RSDYVAMFGV	-1.04	Non-Toxin	EYTDQRQEIS	-1.49	Non-Toxin	ITFGYQQITN	-1.22	Non-Toxin
SDYVAMFGVN	-1.16	Non-Toxin	YTQDRQEISF	-1.63	Non-Toxin	TFGYQQITNP	-0.9	Non-Toxin
DYVAMFGVNH	-1.06	Non-Toxin	TQDRQEISFQ	-1.68	Non-Toxin	FGYQQITNPG	-0.86	Non-Toxin
YVAMFGVNHD	-1.15	Non-Toxin	QDRQEISFQT	-1.44	Non-Toxin	GYQQITNPGE	-0.86	Non-Toxin
VAMFGVNHDN	-1.07	Non-Toxin	DRQEISFQTG	-1.13	Non-Toxin	YQQITNPGEK	-0.97	Non-Toxin
AMFGVNHDNG	-1.03	Non-Toxin	RQEISFQTGV	-1.15	Non-Toxin	QQITNPGEKA	-1.16	Non-Toxin
MFGVNHDNGF	-1.13	Non-Toxin	QEISFQTGVK	-1.13	Non-Toxin	QITNPGEKAP	-1.02	Non-Toxin
FGVNHDNGFS	-1.25	Non-Toxin	EISFQTGVKL	-1.26	Non-Toxin	ITNPGEKAPL	-1.11	Non-Toxin
GVNHDNGFSV	-1.18	Non-Toxin	ISFQTGVKLS	-1.25	Non-Toxin	TNPGEKAPLK	-1.16	Non-Toxin
VNHDNGFSVE	-1.01	Non-Toxin	SFQTGVKLSN	-1.18	Non-Toxin	NPGEKAPLKN	-1.07	Non-Toxin
NHDNGFSVES	-0.86	Non-Toxin	FQTGVKLSNN	-1.16	Non-Toxin	PGEKAPLKNF	-1.56	Non-Toxin
HDNGFSVESR	-0.91	Non-Toxin	QTGVKLSNNW	-0.99	Non-Toxin	GEKAPLKNFN	-1.5	Non-Toxin
DNGFSVESRG	-0.74	Non-Toxin	TGVKLSNNWS	-1.09	Non-Toxin	EKAPLKNFNF	-1.46	Non-Toxin
NGFSVESRGR	-0.69	Non-Toxin	GVKLSNNWSI	-1.23	Non-Toxin	KAPLKNFNFS	-1.51	Non-Toxin
GFSVESRGRF	-0.75	Non-Toxin	VKLSNNWSIN	-1.04	Non-Toxin	APLKNFNFSL	-1.51	Non-Toxin
FSVESRGRFN	-0.79	Non-Toxin	KLSNNWSINN	-1.09	Non-Toxin	PLKNFNFSLS	-1.58	Non-Toxin
SVESRGRFNK	-0.56	Non-Toxin	LSNNWSINNN	-0.99	Non-Toxin	LKNFNFSLSL	-1.51	Non-Toxin
VESRGRFNKI	-0.81	Non-Toxin	SNNWSINNNV	-0.93	Non-Toxin	KNFNFSLSLR	-1.46	Non-Toxin
ESRGRFNKIT	-1.02	Non-Toxin	NNWSINNNVVS	-0.96	Non-Toxin	NFNFSLSLRT	-1.49	Non-Toxin
SRGRFNKITG	-0.94	Non-Toxin	NWSINNNVSY	-1.07	Non-Toxin	FNFSLSLRTI	-1.4	Non-Toxin
RGRFNKITGK	-0.99	Non-Toxin	WSINNNVSYD	-1.05	Non-Toxin	NFSLSLRTIA	-1.34	Non-Toxin
GRFNKITGKI	-1.11	Non-Toxin	SINNNVSYDL	-0.96	Non-Toxin	FSLSLRTIAD	-1.08	Non-Toxin
RFNKITGKIR	-1.05	Non-Toxin	INNNVSYDLV	-0.91	Non-Toxin	SLSLRTIADF	-1.08	Non-Toxin
FNKITGKIRR	-1.07	Non-Toxin	NNNVSYDLVS	-0.97	Non-Toxin	LSLRTIADFG	-1.21	Non-Toxin
NKITGKIRRN	-0.9	Non-Toxin	NNVSYDLVSR	-0.97	Non-Toxin	SLRTIADFGQ	-1.06	Non-Toxin
KITGKIRRNE	-0.98	Non-Toxin	NVSYDLVSRK	-0.95	Non-Toxin	LRTIADFGQK	-1.03	Non-Toxin
ITGKIRRNEI	-0.93	Non-Toxin	VSYDLVSRKF	-0.76	Non-Toxin	RTIADFGQKI	-1.07	Non-Toxin
TGKIRRNEIE	-0.78	Non-Toxin	SYDLVSRKFKV	-0.69	Non-Toxin	TIADFGQKIK	-1.05	Non-Toxin
GKIRRNEIEA	-0.9	Non-Toxin	YDLVSRKFKVK	-0.5	Non-Toxin	IADFGQKIKL	-1.04	Non-Toxin
KIRRNEIEAS	-0.92	Non-Toxin	DLVSRKFKVKQ	-0.49	Non-Toxin	ADFGQKIKLN	-1.18	Non-Toxin
IRRNEIEASQ	-0.91	Non-Toxin	LVSFKFKVQKG	-0.66	Non-Toxin	DFGQKIKLNL	-1.16	Non-Toxin
RRNEIEASQK	-0.95	Non-Toxin	VSRKFKVQKGI	-0.75	Non-Toxin	FGQKIKLNLL	-1.03	Non-Toxin
RNEIEASQKW	-0.8	Non-Toxin	SRKFKVQKGIN	-0.59	Non-Toxin	GQKIKLNLLE	-1	Non-Toxin
NEIEASQKWS	-0.97	Non-Toxin	RKFKVQKGINL	-0.54	Non-Toxin	QKIKLNLLEH	-0.89	Non-Toxin
EIEASQKWSN	-0.99	Non-Toxin	KFKVQKGINLS	-0.62	Non-Toxin	KIKLNLLEHH	-0.94	Non-Toxin
IEASQKWSNL	-0.88	Non-Toxin	FVKQKGINLSY	-0.88	Non-Toxin	IKLNLLEHHH	-0.97	Non-Toxin
EASQKWSNLW	-0.8	Non-Toxin	VKQKGINLSYI	-0.84	Non-Toxin	KLNLLEHHHH	-0.99	Non-Toxin
ASQKWSNLWI	-0.32	Non-Toxin	KQKGINLSYID	-0.87	Non-Toxin	LNLEHHHHHH	-1	Non-Toxin
SQKWSNLWIA	-0.23	Non-Toxin	QGKGINLSYIDE	-0.82	Non-Toxin	NLEHHHHHHH	-0.96	Non-Toxin
QKWSNLWIAT	-0.07	Non-Toxin	GINLSYIDEC	-0.24	Non-Toxin			

ANEXO D

Péptidos del dominio extracelular de LptD que muestran una unión fuerte con HLA-I					
Tipo de HLA-A	% de Afinidad	Péptido	Tipo de HLA-A	% de Afinidad	Péptido
HLA-A*02:01	0.2471	LLTPHFFYA	HLA-A*68:01	0.0314	MVPDPAEKR
	0.2886	VLPRIDYFL		0.2667	TLSGTFYTK
	0.2083	SMATIGLEL		0.169	TVDAQNTNR
	0.1157	HILEPTVQV		0.1205	NSNMQSIYR
	0.0447	SLVGQSFHL		0.1168	IIIPTLALR
HLA-A*23:01	0.0437	FFYANHLGF		0.1696	MATIGLELR
	0.4839	YFWNLSPHY		0.4068	ATIGLELRY
	0.4997	HFKTGIYSI		0.4611	EISFQTGVK
	0.2655	IYSIRFAHI		0.0449	NVSYDLVSR
	0.0069	IYQTNPHNF		0.2146	VSYDLVSRK
	0.3091	RWTYGDIF	0.4761	ECFGITFGY	
	0.0407	IFAQSDPHF	HLA-A*01:01	0.1619	YSIRFAHIY
	0.0369	YFDTRFYHF		0.4831	FLTPEEPVY
	0.4511	HFQIQDSMF		0.16	ATIGLELRY
	0.2004	IYRSHAAGF		0.4136	NLSKNWSFY
	0.345	ILEPTVQVF	0.3266	WSINNNVSY	
	0.2628	FVFDSTTLF	HLA-A*03:01	0.3971	GLLTPHFFY
	0.0206	FYSLVGQSF		0.0454	TLSGTFYTK
	0.0568	SYDLVSRKF		0.4388	TQLSGIAGK
0.5355	KFVKQGINL	0.4235		IIIPTLALR	
0.141	SYIDECFGI	0.1215		HTLNSSSTK	
HLA-A*24:02	0.0756	FFYANHLGF		0.3204	ATIGLELRY
	0.1374	IYSIRFAHI		0.4838	GQSFHLAGK
	0.0037	IYQTNPHNF		0.0279	VSYDLVSRK
	0.2446	RWTYGDIF		0.0467	RTIADFGQK
	0.0475	IFAQSDPHF		HLA-A*26:01	0.1997
	0.0274	YFDTRFYHF	0.2223		WVLPRIIDYF
	0.3979	HFQIQDSMF	0.1006		ATIGLELRY
	0.1415	IYRSHAAGF	0.0098		FVFDSTTLF
	0.4089	ILEPTVQVF	0.4281		FQRDKFSGY
	0.4633	FVFDSTTLF	0.2922		FSVESRGRF
0.0185	FYSLVGQSF	0.179	WSINNNVSY		
0.048	SYDLVSRKF	0.0986	ECFGITFGY		
0.1541	SYIDECFGI	0.2758	SIRFAHIYQ		
HLA-A*31:01	0.3602	MMATKGDFR	0.3544		RINSRWTYG
	0.3306	KGDFRINSR	0.0784	HTLNSSSTK	
	0.0372	AQSDPHFSR	0.4852	STKFNVASS	
	0.3814	SQQAWLPR	0.4133	KFNVASSAA	
	0.1989	SGIAGKSFR	0.3884	SSAAIRMA	
	0.1114	IIIPTLALR	0.3302	GTRANIGLR	
	0.1419	GTRANIGLR	0.2151	KIRRNEIEA	
	0.1191	AGKNSFAER	0.1538	VSYDLVSRK	
	0.391	FYSGIETAR	0.0456	RTIADFGQK	
	0.278	NFNFSLSLR	HLA-A*33:01	0.3168	MVPDPAEKR
0.4583	RTIADFGQK	0.206		MMATKGDFR	
		0.0373		NYFDTRFYH	
		0.0856		NSNMQSIYR	
		0.11		IIIPTLALR	
		0.1701		NVASSAIR	
		0.0364		FYSGIETAR	
		0.1656	NVSYDLVSR		
		0.4632	DLVSRKFVK		
		0.0093	NFNFSLSLR		

Péptidos del dominio extracelular de LptD que muestran una unión fuerte con HLA-I					
Tipo de HLA-B	% de Afinidad	Péptido	Tipo de HLA-B	% de Afinidad	Péptido
HLA-B*07:02	0.1757	YPFLITSEI	HLA-B*08:01	0.4427	HFKTGIYSI
	0.2602	FPNEDAQSF		0.4284	TARSDYVAM
	0.3453	TARSDYVAM		0.2419	ESRGRFNKI
HLA-B*15:01	0.2929	LGFGIKNSY	HLA-B*14:01	0.042	TGKIRNEI
	0.0317	RQHFKTGIY		0.3261	EASQKWSNL
	0.452	YSIRFAHIY		0.3203	SRWTYGWDI
	0.3379	AQNTNRYMM		0.0335	YHFQIQDSM
	0.2367	FLTPPEEPVY		0.0489	NHSQQAWVL
	0.144	IAINAHENY		0.4824	KRENTQNGF
	0.0617	TLNSSSTKF		0.1922	NGFIIIPTL
	0.2169	ATIGLELRY		0.429	FIIIPTLAL
	0.1132	ILEPTVQVF		0.3275	HENYNAHTL
	0.0432	FVFDSTTLF		0.1327	IRSMATIGL
	0.0129	FQRDKFSGY		0.2392	SKNWSFYSL
	0.027	IQNQPDYFY		0.0797	FHLAGKNSF
	0.2021	WSINNNVSY		0.0761	ERDPINTGF
	0.4987	VKQGINLSY		0.2209	ARSDYVAMF
HLA-B*35:01	0.3705	FLTPPEEPVY	HLA-B*18:01	0.2058	YDFTLSGTF
	0.3321	LGFGIKNSY		0.0905	TEGEWRQHF
	0.0168	YSIRFAHIY		0.1374	HENHSQQAW
	0.2484	NPVQTSQLY		0.3234	GELTFNSNM
	0.116	IAINAHENY		0.1497	GELEWKKRF
	0.1672	YPFLITSEI		0.0809	HENYNAHTL
	0.0016	FPNEDAQSF		0.3288	FPNEDAQSF
	0.0466	FVFDSTTLF		0.0191	NEDAQSFVF
	0.2061	TARSDYVAM		0.039	NEIEASQKW
	0.4779	IQNQPDYFY		0.4158	QEISFQTGV
HLA-B*39:01	0.1418	WSINNNVSY	HLA-B*27:02	0.4158	GEKAPLKNF
	0.3343	SRWTYGWDI		0.013	FRINSRWTY
	0.0066	YHFQIQDSM		0.079	SRWTYGWDI
	0.014	NHSQQAWVL		0.0783	SRAYKIETY
	0.1268	HENYNAHTL		0.0288	FRLTGELEW
	0.0817	IRSMATIGL		0.0103	KRENTQNGF
	0.315	SMATIGLEL		0.1907	IRSMATIGL
	0.4601	YPFLITSEI		0.0374	TRANIGLRY
	0.4726	FPNEDAQSF		0.1625	ERDPINTGF
	0.1775	SKNWSFYSL		0.0124	ARSDYVAMF
	0.039	FHLAGKNSF		0.3989	PHEFYANHL
	0.0518	ERDPINTGF		0.4783	FRINSRWTY
	0.2647	ARSDYVAMF		0.1577	SRWTYGWDI
HLA-B*40:01	0.3844	AEKRVSGLL	HLA-B*38:01	0.0049	YHFQIQDSM
	0.0757	GELTFNSNM		0.0072	NHSQQAWVL
	0.3509	GELEWKKRF		0.0809	FRLTGELEW
	0.0324	HENYNAHTL		0.3478	KRENTQNGF
	0.2731	NEDAQSFVF		0.0889	HENYNAHTL
	0.153	QEISFQTGV		0.1869	IRSMATIGL
	0.4446	ADFGQKIKL		0.1031	NEDAQSFVF
HLA-B*44:02	0.4934	AEKRVSGLL	HLA-B*38:01	0.3987	SKNWSFYSL
	0.0577	TEGEWRQHF		0.0136	FHLAGKNSF
	0.2885	GDFRINSRW		0.0149	ERDPINTGF
	0.0027	HENHSQQAW		0.0962	ARSDYVAMF
	0.3488	GELTFNSNM		0.4892	NEIEASQKW
	0.0345	GELEWKKRF		0.3865	TQDRQEISF
	0.0952	HENYNAHTL		0.4935	VKLSNNWSI
	0.2059	NEDAQSFVF		0.4296	AEKRVSGLL
	0.001	NEIEASQKW		0.2247	GELTFNSNM
				HLA-B*49:01	

	0.1997	QEISFQTGV		0.2163	GELEWKKRF	
	0.0493	GEKAPLKNF		0.1104	HENYNAHTL	
HLA-B*48:01	0.1792	AQNTNRYMM		0.1214	LELRYPFLI	
	0.204	YHFQIQDSM		0.2537	LEPTVQVFI	
	0.4008	QQAWVLPRI		0.2397	VEGGTRANI	
	0.4022	GELTFNSNM		0.4063	AERDPINTG	
	0.4696	KRFNTQNGF		0.3184	IETARSDYV	
	0.106	HENYNAHTL		0.2936	NEIEASQKW	
	0.1757	SMATIGLEL		0.05	QEISFQTGV	
	0.208	SKNWSFYSL		0.4299	GEKAPLKNF	
	0.4364	ARSDYVAMF	HLA-B*52:01	0.4307	YDFTLSGTF	
	0.0955	KNFNFSLSL		0.1505	QQAWVLPRI	
	0.2817	ADFGQKIKL		0.0925	NGFIIIPTL	
	0.4366	GQKIKLNLL		0.1338	AAIRSMATI	
	HLA-B*51:01	0.2608		VPDPAEKRV	0.0779	LELRYPFLI
		0.3283		NGFIIIPTL	0.1546	YPFLITSEI
0.0043		YPFLITSEI		0.4099	ITSEISTHI	
0.273		FPNEDAQSF		0.1646	LEPTVQVFI	
				0.3307	FVFDSTTLF	
				0.3979	SDYVAMFGV	
				0.373	QEISFQTGV	
				0.2324	ISFQTGVKL	
				0.2404	KNFNFSLSL	