Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Diseño de un candidato vacunal multiepitópico contra *Bartonella bacilliformis* por inmunoinformática

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Genética y Biotecnología

AUTOR

Damaris Belen RIVERA ASENCIOS

ASESOR

Dra. Ruth GARCIA DE LA GUARDA

Lima, Perú

2022

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

Rivera, D. (2022). *Diseño de un candidato vacunal multiepitópico contra Bartonella bacilliformis por inmunoinformática*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Damaris Belen Rivera Asencios
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74146427
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3462-1791
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Ruth Hortensia García de la Guarda
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06041081
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4801-5642
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Dan Erick Vivas Ruiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41951131
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Patricia Gloria Woll Toso
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10587728
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Carmen Amelia Pantigoso Flores de Durand
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08565770
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Ruth Hortensia García de la Guarda
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	06041081
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.6.3. Microorganismo y parásitos emergentes y reemergentes
Grupo de investigación	Genómica funcional de microorganismos y biorremediación- MICROGEN
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Trabajo de Investigación para optar al grado académico de Bachiller. B20100010a.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Urbanización: Ciudad Universitaria Calle: Av. República de Venezuela Latitud: -12.059777 Longitud: -77.082241
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020-2021
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER EN GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)

Siendo las 10:XX horas del 03 de agosto de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue https://meet.google.com/mnq-xedf-him, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Genética y Biotecnología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **DAMARIS BELEN RIVERA ASENCIOS.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N° UNMSM-20220018543**, la graduando expuso su Trabajo de Investigación: **"DISEÑO DE UN CANDIDATO VACUNAL MULTIEPITÓPICO CONTRA *Bartonella bacilliformis* POR INMUNOINFORMÁTICA"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado 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 **Grado Académico de Bachiller en Genética y Biotecnología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** a **DAMARIS BELEN RIVERA ASENCIOS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 11:25 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 03 de agosto de 2022.

UNMSM Firmado digitalmente por VIVAS RUIZ Dan Erick FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.08.2022 12:27:48 -05:00

Dr. DAN VIVAS RUIZ
(PRESIDENTE)

UNMSM Firmado digitalmente por GARCIA DE LA GUARDA Ruth Hortensia FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.08.2022 12:22:53 -05:00

Dra. RUTH GARCIA DE LA GUARDA
(ASESORA)

Mg. CARMEN PANTIGOSO FLORES
(MIEMBRO)

UNMSM Firmado digitalmente por WOLL TOSO Patricia Gloria FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.08.2022 11:54:17 -05:00

Mg. PATRICIA WOLL TOSO
(MIEMBRO)

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

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

ESCUELA PROFESIONAL : GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL : Mónica Paredes Anaya
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMATICO DE SIMILITUDES : DANIEL SAUL ORÉ CHÁVEZ
DOCUMENTO EVALUADO* : Diseño de un candidato vacunal multiepitópico contra *Bartonella bacilliformis* por Inmunoinformática.
AUTOR DEL DOCUMENTO** : Est. Damaris Belen Rivera Asencios
FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO : 14 / 07 / 2022
FECHA DE APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMATICO : 25 / 07 / 2022
SOFTWARE UTILIZADO :
TURNITIN (X)
ITHENTICATE ( )
OTRO

CONFIGURACION DEL PROGRAMA DE SIMILITUDES
Excluye textos entrecomillados (X)
Excluye bibliografía (X)
Excluye cadenas menores a 40 palabras (X)
Otro criterio ( ) (especificar)

PORCENTAJE DE SIMILITUDES * :** 2 POR CIENTO, 2%

FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS ** :**
https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0205933 **1%**
http://repositorio.cmp.org.pe/ **1%**

OBSERVACIONES:
CALIFICACION DE ORIGINALIDAD:
Documento cumple criterios de originalidad sin observaciones (X)
Documento cumple criterios de originalidad con observaciones ( )
Documento no cumple criterios de originalidad ( )

FECHA DEL INFORME : 26 / 07 /2022

Daniel Oré Chávez
DNI: 10093526 COD:OA2046

UNMSM Firmado digitalmente por PAREDES ANAYA Monica Yolanda FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 02.08.2022 11:29:11 -05:00

FIRMA DEL EVALUADOR

FIRMA DEL DIRECTOR EP

* Tesis para grado o título de pregrado ó Trabajo de Investigación para Bachiller.
** Apellidos y nombres completos
*** En letras y números
**** Indicarlas en orden decreciente y su respectivo porcentaje

Índice

I. Introducción 1

II. Materiales y métodos 8

III. Resultados 13

IV. Discusión 24

V. Conclusiones 27

Índice de tablas

Tabla 1.- Casos de la enfermedad de Carrión y otras Bartonelosis durante el 2020..... 2
Tabla 2.- Esquema de obtención de epítopos de células T para el grupo A 14
Tabla 3.- Esquema de obtención de epítopos de células T para el grupo B 14
Tabla 4.- Epítopos finales del constructo vacunal I. Se indica el epítopo y la proteína de membrana externa correspondiente..... 17
Tabla 5.- Epítopos finales del constructo vacunal II. Se indica el epítopo y la proteína asociada a virulencia correspondiente 18
Tabla 6.- Estadísticas del mejor cluster del docking constructo vacunal II-TLR4/MD2. 23

Índice de figuras

Figura 1.- Distribución de casos de la enfermedad de Carrión durante el 2020, según sexo y edad 2
Figura 2.- Frotis sanguíneo correspondiente a un paciente en la fase aguda de la enfermedad de Carrión 3
Figura 3.- Verruga de forma miliar diseminada..... 3
Figura 4.- Estructura cristal de la proteína locus B asociada a la invasión..... 5
Figura 5.- Modelo tridimensional de la proteína multiepitópica M1 7
Figura 6.- Docking molecular del constructo vacunal (azul) y el TLR4 (amarillo) 8
Figura 7.- Algoritmo para la evaluación de epítopos de células T de *B. bacilliformis* KC583..... 9
Figura 8.- Algoritmo para la evaluación de epítopos de células B de *B. bacilliformis* KC583..... 9
Figura 9.- Esquema de constructos vacunales..... 12
Figura 10.- Algoritmo para la evaluación de constructos vacunales 12
Figura 11.- Estructura final del constructo vacunal I visualizado en Pymol 18
Figura 12.- Estructura final del constructo vacunal II visualizado en Pymol 19
Figura 13.- Plot de Ramachandran de la estructura del mejor modelo del constructo vacunal I (A) y del constructo vacunal II (B) 20
Figura 14.- Z-score para el mejor modelo del constructo vacunal I (A) y II (B)..... 20
Figura 15.- Gráficas generadas durante el proceso de minimización de energía y equilibración de la estructura del constructo vacunal I. Gráfica del potencial de energía (A), temperatura (B), presión (C) y densidad del sistema (D) 21
Figura 16.- Gráficas generadas durante el proceso de minimización de energía y equilibración de la estructura del constructo vacunal II. Gráfica del potencial de energía (A), temperatura (B), presión (C) y densidad del sistema (D) 22
Figura 17.- Gráfica *root-mean-square-deviation* (RMSD) del constructo vacunal II (A) y I (B)..... 23
Figura 18.- Complejo de docking constructo vacunal II-TLR4/MD2. (A) TLR4/MD2 (azul y azul claro) y constructo vacunal II (verde) 24

I. Introducción

1. Planteamiento del problema

Bartonella bacilliformis es el agente causal de la enfermedad de Carrión o fiebre de la Oroya en humanos (Henriquez-Camacho et al., 2015). Esta enfermedad representa un grave problema de salud pública en valles interandinos y zonas selváticas del territorio peruano (Tejada et al., 2003).

Actualmente, existen limitados estudios enfocados en el desarrollo de vacunas contra *B. bacilliformis*. Además, se ha reportado que a pesar de que la enfermedad de Carrión se encuentra restringida a un área, es posible que haya una expansión de la distribución del vector que propicie un futuro esparcimiento a otras áreas (Gomes et al., 2016a). Adicionalmente, se han reportado cepas de *B. bacilliformis* que presentan resistencia constitutiva a las quinolonas (del Valle, 2010). Por ello, es imperativo el diseño de estrategias enfocadas en el control de la enfermedad.

2. Delimitación del problema

La enfermedad de Carrión es endémica en Perú, Ecuador y Colombia; afecta principalmente valles interandinos en altitudes entre 500-3200 msnm (Sanchez Clemente et al., 2012). Dados los limitados estudios enfocados en el desarrollo de vacunas contra *B. bacilliformis*; no se han desarrollado vacunas disponibles para prevenir la enfermedad de Carrión (Breitschwerdt, 2014). Hasta el momento se han reportado proteínas involucradas en la interacción entre *B. bacilliformis* y el hospedero humano como posibles candidatos para la generación de una vacuna sintética (Henriquez- Camacho et. al, 2015). También se ha evaluado una proteína multiepitópica como candidata vacunal (Padilla et. al, 2019), se ha administrado una vacuna cruda hecha a partir de 4 cepas de *B. bacilliformis* inactivadas (Howe y Hertig, 1943) y se han empleado herramientas bioinformáticas para identificar posibles proteínas candidatas (Thibau et. al, 2019) y para diseñar un candidato vacunal multiepitópico (Gul et al., 2020). Sin embargo, aún se requieren más estudios complementarios. Por ello, dado el problema que representa la enfermedad de Carrión, el desarrollo de una vacuna contra el agente causal, *B. bacilliformis*, sería una alternativa viable y efectiva para su control.

3. Antecedentes

3.1. Bartonella bacilliformis

Es el organismo causal de la enfermedad de Carrión y es transmitida mediante picaduras por el mosquito de arena del género *Lutzomyia,* siendo *L. verrucarum* y *L. peruensis* los principales vectores de esta enfermedad (Zorrilla et al., 2017). Esta enfermedad es endémica en el Perú, Ecuador y Colombia (Nunura, 2012)

3.2. Epidemiología de la enfermedad de Carrión

En el 2020 se reportaron 36 casos de la enfermedad de Carrión con una incidencia acumulada de 0,11 casos por cada 100 000 habitantes. Concentrándose la mayor cantidad de casos notificados en los departamentos de Áncash (27.78%), Ayacucho (13.89%), Amazonas (13.89%) y Lima (11.11%) (Tabla 1).

Los grupos principalmente afectados son niños (62%), le siguen los adultos jóvenes (12.12%) y adultos (16.67%). El sexo masculino es el más afectado (Figura 1)

En el 2021 (a la Semana Epidemiológica 9), se han reportado 4 casos de la enfermedad de Carrión procedentes de Ayacucho, Cusco y Lima (Centro Nacional de Epidemiología,Prevención y Control de Enfermedades, 2021, p. 291).

Tabla 1.- Casos de la enfermedad de Carrión y otras Bartonelosis durante el 2020.

Departamento	Enfermedad de Carrión Aguda	Enfermedad de Carrión Eruptiva	Total casos	%	IA x 100 mil Hab.	Enfermedad de Carrión no determinada	IA x 100 mil Hab.
ANCASH	5	5	10	27.78	0.85	26	3.89
AYACUCHO	5	0	5	13.89	0.75	0	0.00
AMAZONAS	2	3	5	13.89	1.17	0	0.00
LIMA	0	4	4	11.11	0.04	0	0.00
CUSCO	3	0	3	8.33	0.22	1	0.07
CAJAMARCA	1	1	2	5.56	0.14	0	0.00
LORETO	2	0	2	5.56	0.19	0	0.00
HUANUCO	1	0	1	2.78	0.13	1	0.13
MADRE DE DIOS	1	0	1	2.78	0.58	0	0.00
APURIMAC	1	0	1	2.78	0.23	0	0.00
LA LIBERTAD	1	0	1	2.78	0.05	1	0.27
JUNIN	1	0	1	2.78	0.07	0	0.00
SAN MARTIN	0	0	0	0.00	0.00	0	0.00
HUANCAVELICA	0	0	0	0.00	0.00	1	0.27
Total general	**23**	**13**	**36**	**100**	**0.11**	**30**	**0.09**

Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades-MINSA.

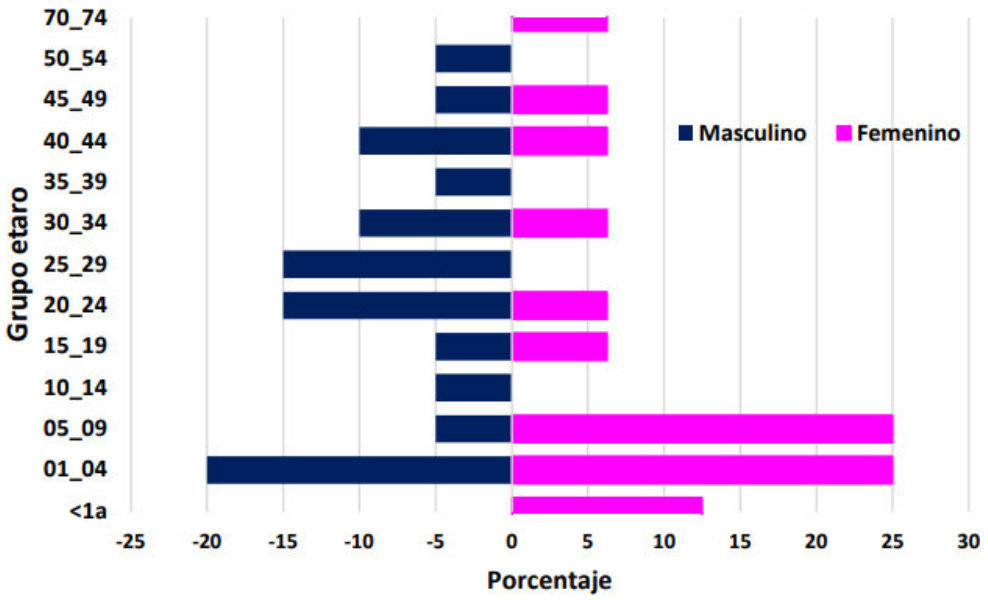

Figura 1.- Distribución de casos de la enfermedad de Carrión durante el 2020, según sexo y edad. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades-MINSA.

3.3. Fases clínicas

La enfermedad de Carrión se caracteriza por causar 2 bien establecidas fases clínicas que pueden ocurrir secuencial o independientemente (Alexander, 1995; Minnick et al., 2014).

3.3.1. Fase aguda

Bartonella bacilliformis infecta eritrocitos humanos causando la fase aguda (Figura 2), también llamada fiebre de la Oroya, que es potencialmente mortal (Garcia-Quintanilla et al., 2019). Se caracteriza principalmente por los siguientes síntomas: fiebre, anemia hemolítica, malestar general, mialgia, ictericia, dolor de cabeza y hepatoesplenomegalia. La fiebre de la Oroya puede perdurar de 1 a 4 semanas, y la mortalidad puede ser muy alta en pacientes no tratados (Minnick et al., 2014).

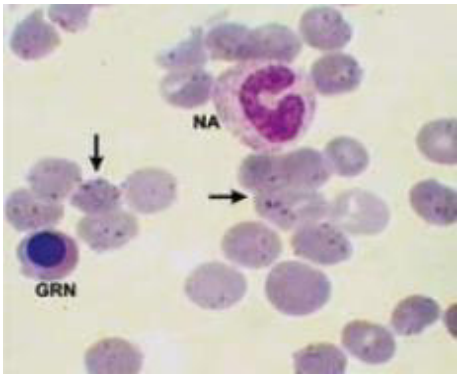

Figura 2.- Frotis sanguíneo correspondiente a un paciente en la fase aguda de la enfermedad de Carrión. Flechas indican glóbulos rojos parasitados por formas bacilares y cocoides correspondientes a B. bacilliformis. Fuente: Acosta et al., 2013.

3.3.2. Fase crónica

La infección crónica de las células endoteliales que resulta en la proliferación endotelial vascular es conocida como fase crónica o "verruga peruana". Se caracteriza por la aparición de erupciones cutáneas modulares (Maguiña et al., 2001; Rojas et. al, 2019; Garcia-Quintanilla et al., 2019) (Figura 3). Persiste de 1 mes a 1 año (Maguiña y Gotuzzo, 2000) y puede sanar sin terapia (Maguiña et al., 2001).

Figura 3.- Verruga de forma miliar diseminada. Fuente: Gonzales et al., 2007.

3.4. Diagnóstico de la enfermedad de Carrión

El diagnóstico de la fiebre de la Oroya se basa principalmente en la visualización de la bacteria intraeritrocitaria que puede aparecer de forma bacilar o cocoide en el frotis de Giemsa-Wright de sangre periférica (Ordaya y Maguiña, 2020; Silva-Díaz et al., 2019). Este método es usado principalmente en zonas endémicas debido a su bajo costo y buena especificidad; sin embargo, tiene una sensibilidad de 25% en comparación con el hemocultivo, depende de la experticia del manipulador y puede estar asociado con un diagnóstico erróneo (Ordaya y Maguiña, 2020; del Valle Mendoza et al., 2014; Silva-Díaz et al., 2019).

Las pruebas serológicas como ELISA, Western blot e inmunofluorescencia indirecta muestran una alta sensibilidad en el diagnóstico tanto de la fiebre de la Oroya como de la verruga peruana; sin embargo,el costo del ensayo y la falta del equipamiento adecuado de laboratorios en zonas endémicas son limitantes (Ordaya y Maguiña, 2020). Por otra parte, pruebas moleculares como la PCR y RT-PCR también se han usado para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión, amplificando el gen *ialB* (Flores, 2008; Gomes et al., 2016b;Chen et al., 2019).

3.5. Proteínas candidatas a vacunas

Estudios con relación a la identificación de candidatos de vacunas contra *B. bacilliformis* describen a las siguientes proteínas (Thibau et al., 2019; Henriquez-Camacho et al., 2015):

3.5.1. IalB

Los genes del locus A y B asociados a la invasión (*ialAB*) de *Bartonella bacilliformis* han demostrado previamente que confieren a *Escherichia coli* poco invasivas la capacidad de invadir eritrocitos (Mitchell y Minnick, 1995), sugiriendo su importante rol en la patogenicidad de esta bacteria. El locus de invasión *ialA* codifica la proteína IalA que contribuye a reducir los niveles de estrés mejorando así la sobrevivencia bacteriana (Conyers y Bessman, 1999). Por otra parte, ensayos de mutagénesis de *ialB* han reportado una disminución significativa de la invasión a eritrocitos humanos en un 47-53%, mientras que la transcomplementación de *ialB* restaura las tasas de invasión a los niveles basales (Coleman y Minnick, 2001). Estos resultados proporcionan evidencia del papel de IalB como factor de virulencia clave de *B. bacilliformis*. Otros estudios han evaluado la expresión del gen *ialB* mediado por señales ambientales tales como cambio de temperatura, cambio de pH, estrés oxidativo o limitación de hemina durante el paso de la bacteria desde el mosquito vector a los humanos; demostrando una variación en la cantidad de ARNm de *ialB* en muestras de *B. bacilliformis* tratadas en condiciones ácidas, básicas y con cambios de temperaturas a 20, 30 y 37°C (Coleman y Minnick, 2003).

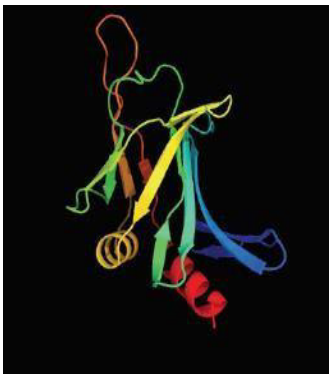

Figura 4.- Modelado de la proteína locus B asociada a la invasión. Fuente: Henriquez-Camacho et al., 2015.

3.5.2. Flagelina

B. bacilliformis es una bacteria altamente móvil lofotrica. Posee entre 1-10 flagelos polares de 3 -10 µm de longitud compuestos de subunidades de flagelina de aproximadamente 42 kDa que son resistentes a tratamientos con proteasas (Kreier y Ristic, 1981; Scherer et al., 1993). Esta proteína ha sido reportada como un componente clave en la invasividad de *B. bacilliformis* ya que se ha demostrado que el antisuero para flagelos reduce significativamente la asociación de *B. bacilliformis* con eritrocitos, en comparación con los controles (Scherer et al., 1993). Ensayos han mostrado concluyentemente que la inactivación del gen *fla* elimina completamente la síntesis del flagelo y genera una cepa de *B. bacilliformis* no móvil y no flagelada ('bald') (Battisti y Minnick, 1999).

3.5.3. Proteínas de repetición de *Bartonella (Brps)*

Proteínas de membrana como las adhesinas triméricas autotransportadoras (ATT) cumplen numerosas funciones importantes en la patogénesis de *Bartonella spp.*, tales como la autoagregación, adherencia a las células endoteliales y a las proteínas de la matriz extracelular y la inducción de la programación de genes angiogénicos. Se pueden encontrar en los genomas de las especies de *Bartonella* secuenciadas, por lo general con varias copias parálogas y pseudogenes (Harms y Dehio, 2012). En *B. bacilliformis* se han reportado 3 genes que codifican ATT. Las adhesinas de *B. bacilliformis* A-C (BbadA-C), llamadas proteínas de repetición de *Bartonella* (Brps), comparten dominios y características estructurales con otras ATT del género *Bartonella,* sugiriendo un rol biológico similar al de las ya reportadas proteínas ATT de *B. henselae* y *B. quintana* (O'Rourke et al., 2011; Thibau et al., 2019). Además, las ATTs BbadA-C han sido descritas como potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas (Henriquez-Camacho et al., 2015).

3.5.4. FtsZ

La proteína FtsZ juega un papel importante en la división celular bacteriana. En comparación con otras bacterias, las proteínas FtsZ de las especies de *Bartonella* son más grandes y tienen una región adicional en el extremo C-terminal, como el homólogo en *Rhizobium* (Kelly et al., 1998). El gen *ftsZ* de *B. bacilliformis* (*ftsZBb*) codifica una proteína de 75 KDa que ha mostrado ser inmunogénica en humanos, siendo el dominio C-terminal de

FtsZBb la región que provoca la respuesta inmunogénica predominante durante el proceso infeccioso (Padmalayam et al., 1997).

3.5.5. Proteínas de unión a hemina (Hbp's)

Las proteínas de unión a hemina (Hpbs) de *Bartonella spp.* son factores de virulencia que unen a la hemina en la superficie bacteriana y diversos estudios han demostrado que las Hpbs contribuyen a la patogénesis de *Bartonella* en diferentes formas (Harms y Dehio, 2012). Las proteínas de unión a hemina de *B. bacilliformis* son homólogas a la proteína Pap31, asociada a bacteriófagos, de *B. henselae* y a las cinco proteínas de unión a hemina de *B. quintana* (Minnick et al., 2003a; Harms y Dehio, 2012; Carroll et.al, 2000). Además, ensayos realizados con la proteína Pap31 indican su rol como una proteína de unión a fibronectina que media en la interacción entre *B. henselae* y su hospedero sugiriendo el mismo rol en Hpbs de *B. baciliformis* (Dabo et al., 2006).

Se ha encontrado que las proteínas de unión a hemina son antígenos altamente expresados en cultivos en crecimiento de *B. bacilliformis* y debido a que son inmunológicamente dominantes, son ideales para usar en ELISA y ensayos de inmunotransferencia con fines de diagnóstico de infección por *B. bacilliformis* (Taye, 2005). Adicionalmente, la homóloga de las Hbps de *B. bacilliformis*, Pap31, ha sido reportada como un posible antígeno blanco para el desarrollo de vacunas y la inducción de inmunidad protectora por lo que las Hpbs también podrían representar antígenos candidatos para el desarrollo de una vacuna contra *B. bacilliformis* (Dabo et al.,2006).

3.5.6. GroEL

Las proteínas de shock térmico GroEL son un grupo altamente conservado de chaperonas por lo que su secuencia codificante ha sido empleada para análisis de relaciones filogenéticas del género *Bartonella* (Zeaiter et al., 2002). GroEl de *B. bacilliformis* ha sido reportado como un factor de virulencia inmunogénico que se encuentra en las fracciones solubles e insolubles y es secretado activamente por *B. bacilliformis*. También se ha estudiado su rol en la mitogenicidad de las células endoteliales vasculares humanas (HUVEC), encontrándose una correlación entre la mitogenicidad de HUVEC y los niveles de GroEL en el lisado de *B. bacilliformis* (Minnick et al., 2003b). Asimismo, se ha demostrado que la exposición a concentraciones altas de GroEl incrementa la apoptosis de células endoteliales vasculares humanas, así posiblemente regulando el crecimiento de células endoteliales (Smitherman, 2005). Por otra parte, se ha descrito a GroEl como un posible candidato para el diagnóstico de infecciones causadas por *B. bacilliformis* mediante pruebas inmunocromatográficas (Aleman Mazulis, 2017). También, debido a la aparente respuesta inmune dirigida a sus regiones no conservadas observada en *Mycobacterium*, epítopos de GroEL específicos de especie, que carecen de homología con la proteína humana, se han considerado candidatos de vacuna (Ferrara et al., 2014).

3.6. Proteínas candidatas a vacuna contra *Bartonella bacilliformis*

3.6.1. Candidato a vacuna diseñado *in silico*

Un trabajo ha identificado a una proteína como candidata a vacuna mediante un enfoque genómico sustractivo. En este trabajo se han empleado herramientas

computacionales y servidores en línea para seleccionar proteínas que no sean homólogas con el proteoma humano, esenciales para el patógeno, que participen en rutas metabólicas exclusivas del patógeno, que se localicen en membrana, con alta antigenicidad y que sean conservadas a nivel de secuencia con diferentes cepas de *B. bacilliformis*. Resultando en la identificación de la proteína de biosíntesis flagelar (FlhA) como candidata a vacuna contra *B. bacilliformis* (Khan et al., 2019).

3.6.2. Vacunas multiepítopos

Hasta la fecha solo un estudio ha realizado el diseño junto con la validación *in vitro* de una posible vacuna contra *B. bacilliformis*. En este estudio se obtuvo el proteoma de *B. bacilliformis* KC583 y se realizó un análisis bioinformático con el fin de seleccionar proteínas de membrana externa. Luego se evaluó si estas proteínas presentaban epítopos que fueran reconocidos por alelos del complejo mayor de histocompatibilidad I y II presentes en la población peruana y se realizaron análisis adicionales para la predicción, conservación y toxicidad de epítopos. Los epítopos se combinaron obteniendo así una proteína multiepitópica llamada M1, la cual se modelizó (Figura 5). También se realizó el clonamiento, expresión y purificación de la proteína multiepitópica en *E. coli* e inmunización deratones con la misma. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de invasión eritrocitaria *in vitro*, demostrándose la utilidad de la proteína multiepitópica diseñada como candidato a vacuna contra *B. bacilliformis* (Padilla et al., 2019).

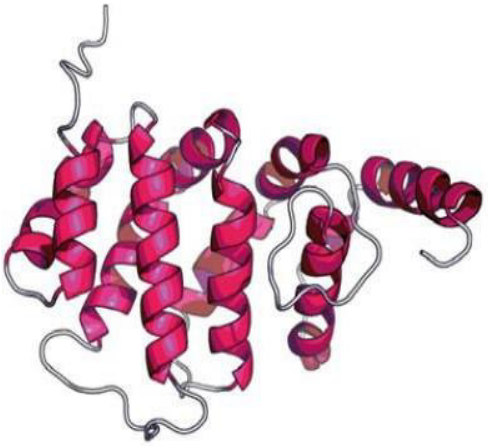

Figura 5.- Modelo tridimensional de la proteína multiepitópica M1. Fuente: Padilla et al., 2019.

Otro estudio ha empleado un enfoque inmunoinformático y proteómico sustractivo para obtener 5 proteínas candidatas a vacunas. En ese trabajo primero se obtuvo el proteoma de *B. bacilliformis* cepa KC583 y se siguió el proceso de proteómica sustractiva con el fin de seleccionar proteínas adecuadas para el diseño de vacunas. Luego se realizó la predicción de epítopos de células B y células T de las mismas proteínas. Posteriormente, se obtuvo el constructo vacunal que se modeló para realizar el *docking* molecular con el receptor tipo toll 4 humano (TLR4) (Figura 6). Además, se realizaron simulaciones de dinámica molecular y finalmente se realizó la optimización de codón y el clonamiento *in silico* de la proteína candidata. Sin embargo, no se realizó la validación experimental (Gul et al., 2020).

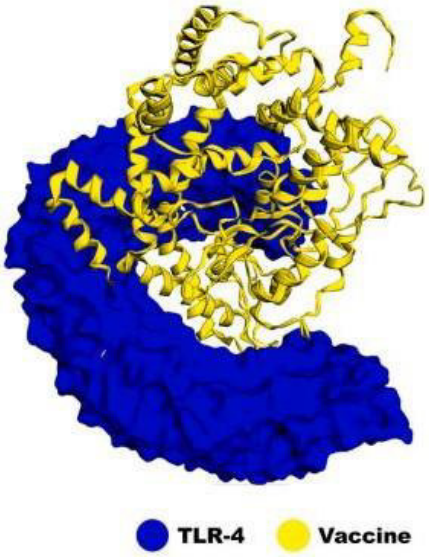

Figura 6.- Docking molecular del constructo vacunal (amarillo) y el TLR4 (azul). Fuente: Gul et al., 2020.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Construir y optimizar *in silico* un candidato vacunal multiepitópico contra *Bartonella bacilliformis.*

4.2. Objetivos específicos

a) Seleccionar los mejores epítopos de células B y T correspondientes a proteínas de membrana externa y asociadas a la virulencia.
b) Construir dos candidatos vacunales, realizar la caracterización fisicoquímica y predicción estructural mediante herramientas bioinformáticas.
c) Ejecutar la simulación de dinámica molecular de dos candidatos vacunales.
d) Seleccionar el mejor candidato vacunal y efectuar el *docking* molecular con el TLR4/MD2.

II. Materiales y métodos

1. Genoma de *B. bacilliformis* empleado

En el presente estudio se utilizó el genoma de *B. bacilliformis* KC853 (GCA_000015445.1). Esta cepa corresponde a un aislado y fue registrado en el año 1957 (Huarochiri -Lima).

2. Análisis bioinformático

Todo el proteoma de *B. bacilliformis* cepa KC583 se analizó empleando herramientas bioinformáticas. Se siguieron los algoritmos mostrados en la Figura 7 y 8 para los epítopos de células T y B; respectivamente.

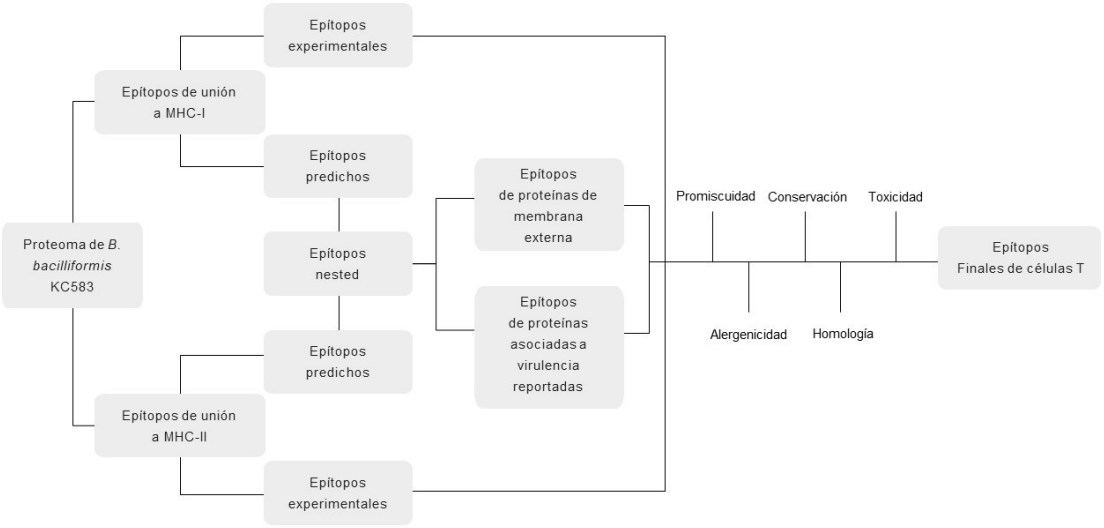

Figura 7.- Algoritmo para la evaluación de epítopos de células T de B. bacilliformis KC583.

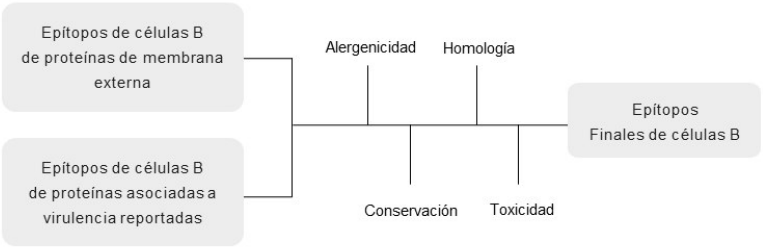

Figura 8.- Algoritmo para la evaluación de epítopos de células B de B. bacilliformis KC583.

2.1. Obtención del proteoma completo

El proteoma completo de *B. bacilliformis* cepa KC583 (UP000000643) se recuperó de la base de datos de Uniprot (https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000643) en formato FASTA.

2.2. Predicción de epítopos de células T

Se realizó la predicción de los epítopos de las proteínas totales de *B. bacilliformis* KC583.

2.2.1. Predicción de epítopos de unión a MHC I

Los epítopos de unión a MHC I, correspondientes a los alelos más frecuentes de la población mundial (HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*27:05, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01 y HLA-B*58:01) (grupo A) y de Perú, Ecuador y Colombia (HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, HLA-B*51:01, HLA-C*04:01 y HLA-C*07:02)

(grupo B), fueron predichos para todo el proteoma de *B. bacilliformis*. Con este propósito se empleó el programa NetMHCpan 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.0/) (Jurtz et al., 2017).

2.2.2. Predicción de epítopos de unión a MHC II

Los epítopos de unión a MHC II, correspondientes a los alelos más frecuentes de la población mundial (HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB4*01:01 y HLA-DRB5*01:01) (grupo A) y de Perú, Ecuador y Colombia (HLA-DRB1*04:07, HLA-DRB1*08:02 y HLA-DRB1*14:02) (grupo B), fueron predichos para todo el proteoma de *B. bacilliformis*. Se empleó el programa NetMHCIIpan 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/) (Reynisson et al., 2020).

2.3. Identificación de epítopos *nested*

Empleando un script en Python se obtuvo información sobre si los epítopos habían sido previamente reportados en experimentos (epítopos experimentales) y el resto de los epítopos fueron denominados epítopos predichos. Usando un script de Python, a partir de este último grupo, se obtuvieron epítopos *nested* (epítopos de unión a MHC II que incluyen a epítopos de unión a MHC I).

2.4. Obtención de epítopos *nested* de proteínas de membrana externa

A partir de los epítopos *nested* totales, se seleccionaron aquellos que correspondían a proteínas de membrana externa predichas según PSORTb (https://www.psort.org/psortb/) (Yu et al., 2010).

2.5. Obtención de epítopos *nested* de proteínas asociadas a virulencia

A partir de los epítopos *nested* totales, se seleccionaron aquellos que correspondían a proteínas asociadas a virulencia registradas en VFDB (http://www.mgc.ac.cn/VFs/) (Liu et al., 2019) y también aquellos que correspondían a proteínas reportadas previamentecomo posibles candidatas vacunales (Thibau et al., 2019; Henriquez-Camacho et al., 2015).

2.6. Predicción de epítopos de células B

La predicción de epítopos de células B se realizó empleando el servidor en línea BepiPred-2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/) (Jespersen et al., 2017). Se predijeron los epítopos de células B de una longitud de 15 aminoácidos correspondientes a proteínas membrana externa y virulentas y se seleccionaron aquellos epítopos con un puntaje mayor o igual a 0.5 y 0.55, respectivamente.

2.7. Evaluación de epítopos

Se evaluaron tanto los epítopos *nested* de células T correspondientes a proteínas de membrana externa, virulentas como los experimentales y los epítopos de células B correspondientes a proteínas de membrana externa y asociadas a virulentas. Se aplicaron los filtros de promiscuidad, homología, conservación, alergenicidad y toxicidad.

2.7.1. Identificación de epítopos promiscuos

Se seleccionaron los epítopos de células T que se unían a una alta cantidad de alelos (epítopos promiscuos).

2.7.2. Identificación de epítopos no homólogos con el proteoma humano y murino

Empleando un script en Python se obtuvo información sobre si los epítopos presentaban una homología del 100% con el proteoma humano (UP000005640) y de ratón (*Mus musculus*) (UP000000589). Se seleccionaron los epítopos con una homología <100% con el proteoma humano (UP000005640) y de ratón (*Mus musculus*) (UP000000589).

2.7.3. Alergenicidad de epítopos

Con el fin de asegurar que los epítopos seleccionados no provocan alguna reacción alérgica, se utilizó el servidor en línea AllerTOP (https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/) (Dimitrov et al., 2014).

2.7.4. Toxicidad de epítopos

Para identificar epítopos altamente tóxicos o no tóxicos, se empleó la herramienta ToxinPred (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi_submit.php) (Gupta et al., 2013). Esta herramienta predice toxicidad junto con propiedades fisicoquímicas importantes.

2.7.5. Conservación de epítopos

A partir de los epítopos no homólogos con el proteoma humano y murino, se analizó la conservación de estos en todas las 17 cepas reportadas de *B. bacilliformis*, según la base de datos del NCBI. Se empleó la herramienta de conservación de epítopos de IEDB (http://tools.iedb.org/conservancy/) (Bui et al., 2007).

2.8. Formación de constructos vacunales

Con el fin de sintetizar *in silico* constructos vacunales del total de epítopos experimentales y *nested* filtrados tanto del grupo A y B junto con los epítopos de células B filtrados, se eliminaron los epítopos repetidos. Los epítopos finales junto con un adyuvante se concatenaron mediante “linkers” para formar dos constructos vacunales (constructo vacunal I y II). El constructo vacunal I estaba conformado por epítopos correspondientes a proteínas de membrana externa y epítopos experimentales. Por otra parte, el constructo vacunal II estaba conformado por epítopos correspondientes a proteínas asociadas a virulencia y epítopos experimentales

El linker “EAAAK” se empleó para unir el adyuvante y el primer epítopo de unión a MHC de clase II. Los epítopos de unión a MHC de clase II y de células B correspondientes a proteínas de membrana externa o asociadas a virulentas junto con los epítopos experimentales, se unieron mediante los “linkers” GPGPG, KK y AAY; respectivamente (Figura 9).

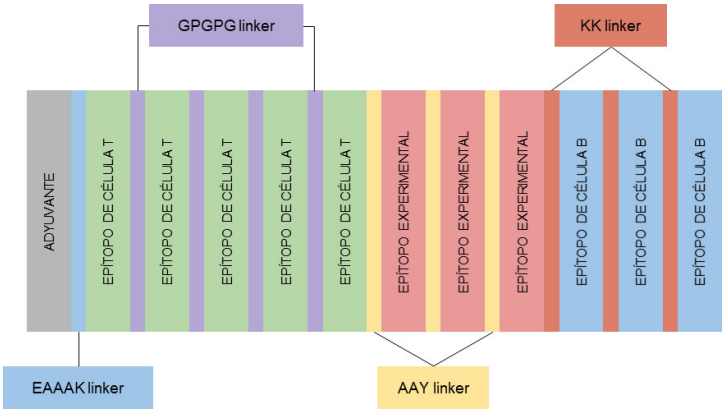

Figura 9.- Esquema de constructos vacunales.

2.9. Evaluación de constructos vacunales

Ambos constructos vacunales se analizaron con relación a sus propiedades fisicoquímicas, estructura secundaria y terciaria. Se siguió el algoritmo mostrado en la Figura 10.

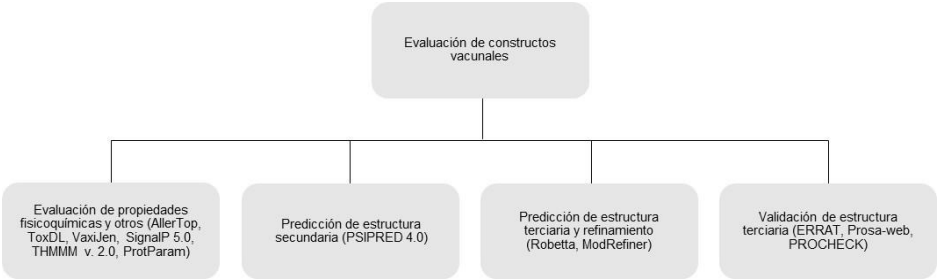

Figura 10.- Algoritmo para la evaluación de constructos vacunales.

2.9.1. Evaluación de alergenicidad, toxicidad, antigenicidad y propiedades fisicoquímicas

La predicción de alergenicidad, toxicidad y antigenicidad de los constructos vacunales fueron evaluadas empleando los servidores en línea AllerTOP (https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/) (Dimitrov et al., 2014), ToxDL (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/ToxDL/) (Pan et al., 2020) y VaxiJen v2.0 (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html) (Doytchinova y Flower, 2007); respectivamente. El valor umbral del último servidor fue 0.4. Otras propiedades fisicoquímicas como la composición aminoacídica, peso molecular, tiempo de vida medio, índice de inestabilidad, índice alifático, PI teórico y GRAVY (grand average of hydropathicity) fueron analizadas mediante la herramienta en línea ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) (Gasteiger et al., 2005). También se evaluó la presencia de algún péptido señal y hélices transmembrana empleando los servidores en línea SignalP 5.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Almagro et al., 2019) y THMMM v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) (Krogh et al., 2001), respectivamente.

2.9.2. Predicción de estructura secundaria

La predicción de estructura secundaria se realizó con PSIPRED 4.0 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) (Jones, 1999).

2.9.3. Predicción de estructura terciaria y refinamiento

La predicción de estructura terciaria se realizó con el servidor Robetta (https://robetta.bakerlab.org/) (Raman et al., 2009) empleando la metodología de predicción estructuras de Rosetta *de novo*. El refinamiento de los modelos se realizó empleando el servidor ModRefiner (https://zhanglab.dcmb.med.umich.edu/ModRefiner/)(Xu y Zhang, 2011).

2.9.4. Validación de estructura terciaria

Para la validación estructural de los modelos se empleó ERRAT (https://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/) (Colovos y Yeates, 1993), Prosa-web (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) (Wiederstein y Sippl, 2007) y PROCHECK 3.6.2. (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html) (Laskowski et al., 1993) y se seleccionó el mejor modelo de cada constructo vacunal.

2.10. Minimización de energía y Dinámica molecular

La minimización de energía del mejor modelo del constructo vacunal I y II se realizó empleando el algoritmo *steepest descents* de GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) (Abraham et al., 2015). El campo de fuerza AMBER99SB-ILDN (Lindorff-Larsen et al., 2010) fue utilizado para generar el archivo de topología requerido para la minimización de energía y equilibración. Luego de la equilibración, se realizó una simulación de dinámica molecular de 40 ns para encontrar el RMSD (Root Mean Square Deviation) del *backbone*.

2.11. Docking Molecular con TLR4

El análisis de *docking* molecular del constructo vacunal I con el TLR4/MD2 se realizó usando el programa HADDOCK 2.4 (https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/) (van Zundert et al., 2016). La estructura del TLR4/MD2 fue obtenida del PDB (Protein Data Bank) ID 3FXI. El mejor cluster fue escogido basado en la puntuación más baja de HADDOCK. Se empleó HADDOCK Refinement Interface para refinar el cluster seleccionado. Finalmente, los residuos que interactúan entre la vacuna y el TLR4 fueron mapeados empleando PDBsum (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html) (Laskowski et al., 2018).

3. Resultados

1. Predicción de epítopos de células T

Se realizó la predicción de los epítopos de CTL (unión a MHC I) y HTL (unión a MHC II) para las proteínas totales de *B. bacilliformis* KC583.

Para el grupo A se obtuvieron un total de 163286 epítopos totales, luego se eliminaron los epítopos repetidos y posteriormente se seleccionaron los epítopos *nested*. La información detallada se muestras a continuación (Tabla 2).

Tabla 2.- Esquema de obtención de epítopos de células T para el grupo A.

Pasos		Sin evidencia experimental		Con evidencia experimental		Total
		MHC-I	MHC-II	MHC-I	MHC-II	
1	Epítopos totales	110021	53220	43	2	163286
2	Epítopos no repetidos	109266	52928	43	2	162239
3	Selección de epítopos *nested*					86042

Para el grupo B se obtuvieron un total de 85524 epítopos totales, luego se eliminaron los epítopos repetidos y posteriormente se seleccionaron los epítopos *nested*, definidos como epítopos de clase II que incluyen epítopos de clase I. La información detallada se muestra a continuación (Tabla 3):

Tabla 3.- Esquema de obtención de epítopos de células T para el grupo B.

Pasos		Sin evidencia experimental		Con evidencia experimental		Total
		MHC-I	MHC-II	MHC-I	MHC-II	
1	Epítopos totales	63563	21942	19	0	85524
2	Epítopos no repetidos	63090	21803	19	0	84912
3	Selección de epítopos *nested*					24497

2. Obtención de epítopos *nested* de proteínas de membrana externa

Luego de la selección de epítopos *nested,* se realizó un filtro adicional de los mismos. Para el grupo A y B se seleccionaron aquellos que correspondían a proteínas de membrana externa, resultando en 1826 y 542 epítopos que cumplieron esta condición.

3. Obtención de epítopos *nested* de proteínas de virulencia

Además, para el grupo A y B se seleccionaron aquellos que correspondían a proteínas de virulencia, resultando en 1432 y 464 epítopos que cumplieron esta condición.

4. Identificación de epítopos de células B

Del total de epítopos de células B correspondientes a proteínas de membrana externa, 90 epítopos presentaban una longitud de 15 aminoácidos y tenían un puntaje de 0.5 según el servidor en línea Bepipred 2.0. Del total de epítopos de células B correspondientes a proteínas de virulencia, 28 epítopos presentaban una longitud de 15 aminoácidos y tenían un puntaje de 0.55 según el servidor en línea Bepipred 2.0.

Luego se eliminaron los epítopos de células B repetidos y se obtuvieron finalmente 79 y 28 epítopos correspondientes a proteínas de membrana externa y proteínas de virulencia; respectivamente.

5. Evaluación de epítopos

5.1. Identificación de epítopos promiscuos

Los epítopos se filtraron con relación a la cantidad de alelos a los cuales se unían. Del total de epítopos correspondientes a proteínas de membrana externa para el grupo A, 330 epítopos interactuaban con 2 alelos, 425 epítopos interactuaban con 3 alelos, 316 interactuaban con 4 alelos, 273 interactuaban con 5 alelos, 225 interactuaban con 6 alelos, 137 epítopos interactuaban con 7 alelos, 57 epítopos interactuaban con 8 alelos, 36 epítopos interactuaban con 9 alelos, 19 epítopos interactuaban con 10 alelos, 5 epítopos interactuaban con 11 alelos, 2 epítopos interactuaban con 12 alelos y 1 epítopo interactuaban con 13 alelos. Por otra parte, del total de epítopos correspondientes a proteínas de membrana externa para el grupo B, 163 epítopos interactuaban con 2 alelos, 140 epítopos interactuaban con 3 alelos, 138 interactuaban con 4 alelos, 70 interactuaban con 5 alelos, 19 interactuaban con 6 alelos y 12 epítopos interactuaban con 7 alelos.

Del total de epítopos correspondientes a proteínas asociadas a virulencia para el grupo A, 231 epítopos interactuaban con 2 alelos, 322 epítopos interactuaban con 3 alelos, 256 interactuaban con 4 alelos, 212 interactuaban con 5 alelos, 217 interactuaban con 6 alelos, 99 epítopos interactuaban con 7 alelos, 51 epítopos interactuaban con 8 alelos, 22 epítopos interactuaban con 9 alelos, 17 epítopos interactuaban con 10 alelos y 5 epítopos interactuaban con 11 alelos. Por otra parte, del total de epítopos correspondientes a proteínas asociadas a virulencia para el grupo B, 135 epítopos interactuaban con 2 alelos, 131 epítopos interactuaban con 3 alelos, 94 interactuaban con 4 alelos, 74 interactuaban con 5 alelos, 20 interactuaban con 6 alelos, 9 epítopos interactuaban con 7 alelos y 1 epítopo interactuaba con 8 alelos.

Del total de epítopos experimentales para el grupo A, 17 epítopos interactuaban con 1 alelo de unión a MHC I, 12 epítopos interactuaban con 2 alelos de unión a MHC I, 4 epítopos interactuaban con 3 alelos de unión a MHC I, 4 epítopos interactuaban con 4 alelos de unión a MHC I, 6 epítopos interactuaban con 5 alelos de unión a MHC I y 2 epítopos interactuaban con 2 alelos de unión a MHC II. Por otra parte, del total de epítopos experimentales para el grupo B, 9 epítopos interactuaban con 1 alelo de unión a MHC I, 1 epítopos interactuaban con 2 alelos de unión a MHC de clase I, 8 epítopos interactuaban con 3 alelos de unión a MHC I y 1 epítopo interactuaba con 4 alelos de unión a MHC I.

Para el grupo A se seleccionaron los epítopos de proteínas de membrana externa con unión a cantidad de alelos totales (MHC I y II) ≥ 7, resultando en 63 epítopos que cumplieron esta condición. Además, se seleccionaron los epítopos de proteínas asociadas a virulencia con unión a cantidad de alelos totales (MHC I y II) ≥ 9, resultando en 44 epítopos que cumplieron esta condición. Para el grupo B se seleccionaron los epítopos de proteínas de membrana externa con unión a cantidad de alelos totales (MHC I y II) ≥ 6, resultando en 31 epítopos que cumplieron esta condición. Además, se seleccionaron los epítopos de proteínas de asociadas a virulencia con unión a cantidad de alelos totales (MHC I y II) ≥ 6, resultando en 30 epítopos que cumplieron esta condición. Adicionalmente, se seleccionaron los epítopos experimentales con unión

a cantidad de alelos totales (MHC I y II) ≥ 3, resultando en 15 y 10 epítopos que cumplieron esta condición para el grupo A y el grupo B, respectivamente.

5.2. Identificación de epítopos no homólogos con el proteoma humano y murino

A partir de los epítopos seleccionados con unión a alta cantidad de alelos, se seleccionaron los epítopos que no tengan identidad y cobertura del 100% con alguna región de las proteínas del proteoma humano y murino. Obteniendo así un total de 63 y 31 epítopos *nested* correspondientes a proteínas membrana externa con interacción a alelos de unión a MHC II para el grupo A y B, respectivamente. Además, se obtuvo un total de 44 y 30 epítopos *nested* correspondientes a proteínas asociadas a virulencia con interacción a alelos de unión a MHC II para el grupo A y B. En relación con los epítopos experimentales, se obtuvo un total de 5 y 6 epítopos con interacción a alelos de unión a MHC I para el grupo A y B, respectivamente.

Con respecto a los epítopos de células B correspondientes a proteínas membrana externa y asociadas a virulencia, se seleccionaron aquellos que no tenían identidad y cobertura del 100% con alguna región de las proteínas del proteoma humano y murino, resultando que ninguno de los epítopos de células B presentaba identidad o cobertura del 100% con alguna región de las proteínas del proteoma humano y murino.

5.3. Identificación de epítopos no alérgenos

Los epítopos *nested* correspondientes a proteínas membrana externa se sometieron al servidor en línea AllerTop y este servidor predijo que 36 y 21 epítopos no eran potenciales alérgenos para el grupo A y B, respectivamente. Además, los epítopos *nested* correspondientes a proteínas de virulencia se sometieron al servidor web AllerTop y este servidor predijo que 22 y 20 epítopos no eran potenciales alérgenos para el grupo A y B, respectivamente. Adicionalmente, los epítopos experimentales se sometieron al servidor web AllerTop y este servidor predijo que 3 y 3 epítopos no eran potenciales alérgenos para el grupo A y B, respectivamente.

Con respecto a los epítopos de células B correspondientes a proteínas membrana externa y virulentas, el servidor AllerTop predijo que 40 y 23 epítopos no eran potenciales alérgenos, respectivamente.

5.4. Identificación de epítopos no tóxicos

Del total de epítopos *nested* y experimentales obtenidos, tanto del grupo A y B, se sometieron al servidor web ToxinPred, resultando que ninguno de los epítopos fue predicho como tóxico por el servidor.

Con respecto a los epítopos de células B correspondientes a proteínas membrana externa y virulentas, el servidor web ToxinPred predijo a ninguno de los epítopos como tóxico.

5.5. Identificación de epítopos conservados entre todas las cepas de *B. bacilliformis*

Se seleccionaron los epítopos *nested* correspondientes a proteínas de membrana externa que tuvieran el ≥ 94.12% de conservación entre todas las cepas de *B. bacilliformis*. Obteniendo finalmente 11 y 18 epítopos para el grupo A y B, respectivamente. También se seleccionaron los epítopos *nested* correspondientes a proteínas asociadas a virulencia que tuvieran el 100.00% de conservación entre

todas las cepas de *B. bacilliformis*. Obteniendo finalmente 14 y 6 epítopos para el grupo A y B, respectivamente. Además, se seleccionaron los epítopos experimentales que tuvieran el 100.00% de conservación entre todas las cepas de *B. bacilliformis*. Obteniendo finalmente 3 y 1 epítopo para el grupo A y B, respectivamente.

Con respecto a los epítopos de células B correspondientes a proteínas membrana externa, se seleccionaron aquellos que tuvieran el 100.00% de conservación entre todas las cepas de *B. bacilliformis*; obteniendo finalmente 9 epítopos que cumplían esta condición. Además, en relación con los epítopos de células B correspondientes a proteínas asociadas a virulencia, se seleccionaron aquellos que tuvieran el 100.00% de conservación entre todas las cepas de *B. bacilliformis*; obteniendo finalmente 11 epítopos que cumplían esta condición.

6. Formación de constructos vacunales

Se obtuvieron 14 epítopos finales (11 epítopos correspondientes a proteínas de membrana externa y 3 epítopos experimentales) que conformaron el constructo vacunal I (Tabla 4) (Figura 11) y 15 epítopos finales (12 epítopos correspondientes a proteínas asociadas a virulencia y 3 epítopos experimentales) que conformaron el constructovacunal II (Tabla 5) (Figura 12).

En ambos constructos vacunales se unió el adyuvante β-defensina (45 aminoácidos)con el “linker” EAAAK al primer epítopo de unión a MHC II.

Tabla 4.- Epítopos finales del constructo vacunal I. Se indica el epítopo y la proteína de membrana externa correspondiente.

Epítopos finales	Proteína	
FAISLSSYGNKLTLSS	A1UTU0	Outer membrane autotransporter
KRAIAAMQLLIERYP	A1UTB7	Outer membrane protein assembly factor BamD
ARSNYREILSALYAD	A1UUD8	Surface antigen/outer membrane protein, OMP85 family
NTQNGFIIIPTLALRADT	A1US68	LPS-assembly protein LptD
YAKYLVDASSYNVKA	A1USK0/ A1USN1	Type I secretion outer membrane protein, TolC family
EQNLFLDVIKAYANVY	A1USK0/ A1USN1	Type I secretion outer membrane protein, TolC family
EGIYNYVNTQHVEIE	A1URQ3	Putative lipoprotein
FRGAVFADAATLYGNNY	A1USE4	Outer membrane protein assembly factor BamA
ISASLAYSYVQEEYN	A1USE4	Outer membrane protein assembly factor BamA
FLSAQVKMQAQRESFRNAE	A1USK0/ A1USN1	Type I secretion outer membrane protein, TolC family
QAQAARSFAVSEYSLARS	A1USK0/ A1USN1	Type I secretion outer membrane protein, TolC family
VLDEPSIGL	A1UST0	UvrABC system protein A
WTIGYDTIY	A1URV9	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase
KLYPNVDFY	A1USF4	Citrate synthase

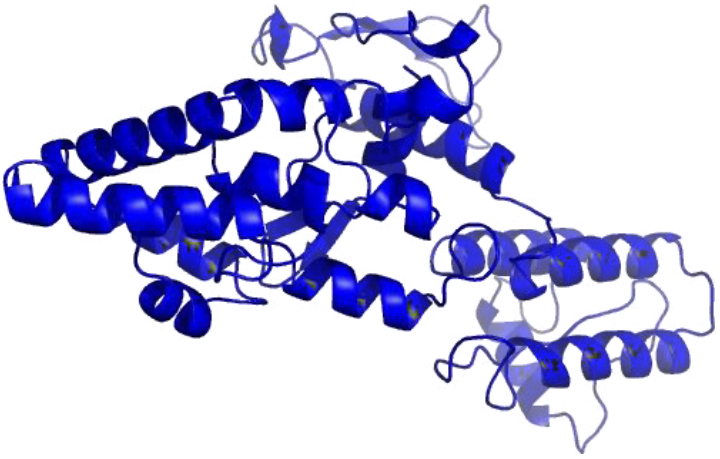

Figura 11.- Estructura final del constructo vacunal I visualizado en Pymol.

Tabla 5.- Epítopos finales del constructo vacunal II. Se indica el epítopo y la proteína asociada a virulencia correspondiente.

Epítopos finales	Proteína	
PRKVTFESSNSLPAG	A1UTS9	Flagellar hook-associated protein FlgK
KAARVHIVLPDKGSF	A1UTT7	Flagellar M-ring protein
MTRLIEVSRAFERVEAM	A1UTV2	Flagellar basal body protein
NARRIIAQTAIKLSEQ	A1UTV8	Putative flagellar motor switch protein FliG
EYIRQKLVDLSLSFI	A1UTV9	Flagellar biosynthetic protein FlhB
PLDFSAFPTVLLIAT	A1UTW6	Flagellar biosynthesis protein FlhA
QRLLPQQVELANRVA	A1UTW6	Flagellar biosynthesis protein FlhA
MAPQYQKQLDEMASA	A1UTS9	Flagellar hook-associated protein FlgK
QKPYQAMQNMADALP	A1UTV4	Lateral flagellar motor protein MotA
LMDEEIHTISSDSQK	A1UTV4	Lateral flagellar motor protein MotA
DEYKNLEGNPMVKSRMR	A1UTV9	Flagellar biosynthetic protein FlhB
NPMVKSRMRSLARDRIRRKMIA	A1UTV9	Flagellar biosynthetic protein FlhB
VLDEPSIGL	A1UST0	UvrABC system protein A
WTIGYDTIY	A1URV9	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase
KLYPNVDFY	A1USF4	Citrate synthase

Figura 12.- Estructura final del constructo vacunal II visualizado en Pymol.

7. Evaluación de constructos vacunales

7.1. Evaluación de alergenicidad, toxicidad, antigenicidad y propiedades fisicoquímicas

El servidor AllerTop predijo que ninguno de los constructos vacunales era un alérgeno y, según ToxDL, la predicción de toxicidad fue 0.001 y 0.0009 para el constructo vacunal I y II; respectivamente. El constructo vacunal I constaba de 306 aminoácidos con un peso molecular de 33.18 kDa. Por otra parte, el constructo vacunal II constaba de 327 aminoácidos con un peso molecular de 35.46 kDa. El puntaje de antigenicidad calculado por VaxiJen fue 0.7348 y 0.6283 para el constructo vacunal I y II; respectivamente. Por otra parte, el servidor ProtParam calculó 9.37 y 9.82 de PI teórico para el constructo vacunal I y II, respectivamente. Esto indica la naturaleza ligeramente ácida de ambos constructos. El índice de inestabilidad indicó el estado estable de ambos constructos vacunales. Además, el tiempo de vida medio del constructo vacunal I y II fue >20 horas y >10 horas en levaduras y *E. coli*. Por otra parte, el GRAVY fue -0.338 y -0.471 para el constructo vacunal I y II, respectivamente. Esto indica la naturaleza hidrofílica de ambos constructos. El índice alifático fue 75.39 y 72.57 para el constructo vacunal I y II, respectivamente. Esto sugiere la naturaleza estable de ambos constructos. Adicionalmente, no se identificó ningún péptido señal ni hélices transmembrana en los constructos vacunales.

7.2. Predicción de estructura secundaria

PSIPRED 4.0 predijo la estructura secundaria de los constructos vacunales I y II. Para el constructo vacunal I predijo 43.79% α-hélices, 18.63% láminas-β y 37.58% *coil*. Para el constructo vacunal II predijo 47.09%, 9.79% láminas-β y 43.12% *coil*.

7.3. Predicción de estructura terciaria y refinamiento

Se empleó el servidor Robetta para generar el modelo 3D de los constructos vacunales. Se generaron 5 modelos para cada constructo vacunal y estos fueron evaluados visualmente usando Pymol. Luego se realizó el refinamiento de la estructura proteica de los modelos empleando ModRefiner.

7.4. Validación de estructura terciaria

Se realizó el análisis del *plot* de Ramachandran de la estructura de los modelos antes y después de refinar; el mejor modelo refinado de cada constructo se seleccionó para posteriores análisis (Anexos). El servidor PROCHECK reveló un *plot* de Ramachandran con 97.6% de residuos en lasregiones más favorecidas, 2.4% de residuos en las regiones permitidas adicionales y ningún residuo en las regiones generosamente permitidas y no permitidas para el mejor modelo del constructo vacunal I (Figura 13A). Por otra parte, para el constructo vacunal II, reveló un *plot* de Ramachandran con 96.5% de residuos en las regiones más favorecidas, 3.5% de residuos en las regiones permitidas adicionales y ningún residuo en las regiones generosamente permitidas y no permitidas (Figura 13B). Según ERRAT, la puntuación calculada para el mejor modelo del constructo vacunal I fue 89.9654 y para el constructo vacunal II fue 78.4566. El z-score según Prosa-web fue de -6.35 (Figura 14A) y -7.97 (Figura 14B) para el mejor modelo delconstructo vacunal I y II, respectivamente.

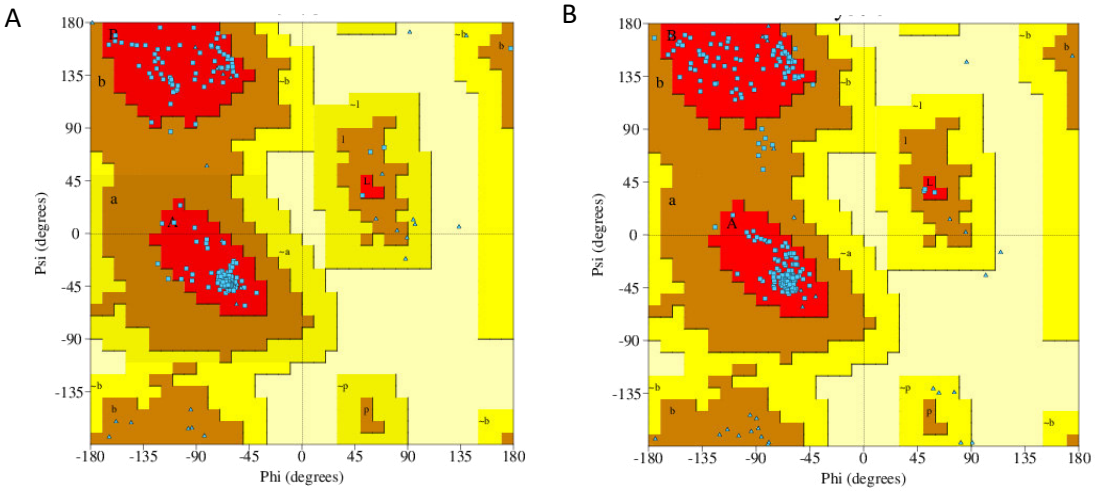

Figura 13.- Plot de Ramachandran de la estructura del mejor modelo del constructo vacunal I (A) y del constructo vacunal II (B).

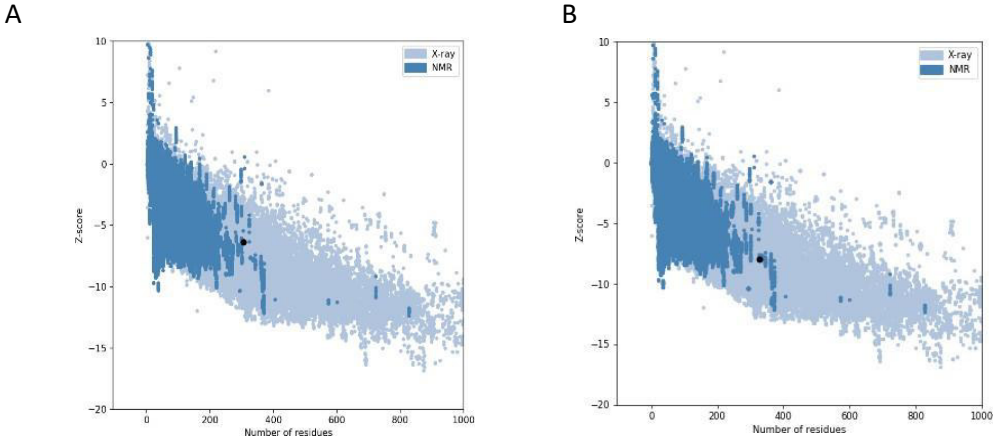

Figura 14.- Z-score para el mejor modelo del constructo vacunal I (A) y II (B).

8. Minimización de energía y Dinámica Molecular

La minimización de energía del constructo vacunal I se llevó a cabo durante 1801 pasos donde la fuerza alcanzó <1000 kJ/mol. El potencial de energía fue de -2.8391938e+06 kJ/mol, mientras que el potencial de energía promedio del sistema durante la minimización de la energía fue -2.76022e+06 kJ/mol con una deriva total de -268653 kJ/mol (Figura 15A). La temperatura promedio fue 299.789 K con una deriva total de 1.29884 K (Figura 15B). La presión promedio fue 0.261968 bar con una deriva total de 7.45235 bar (Figura 15C), mientras que la densidad promedio fue 993.384 kg/m³ con una deriva total de 0.404228 kg/m³ (Figura 15D).

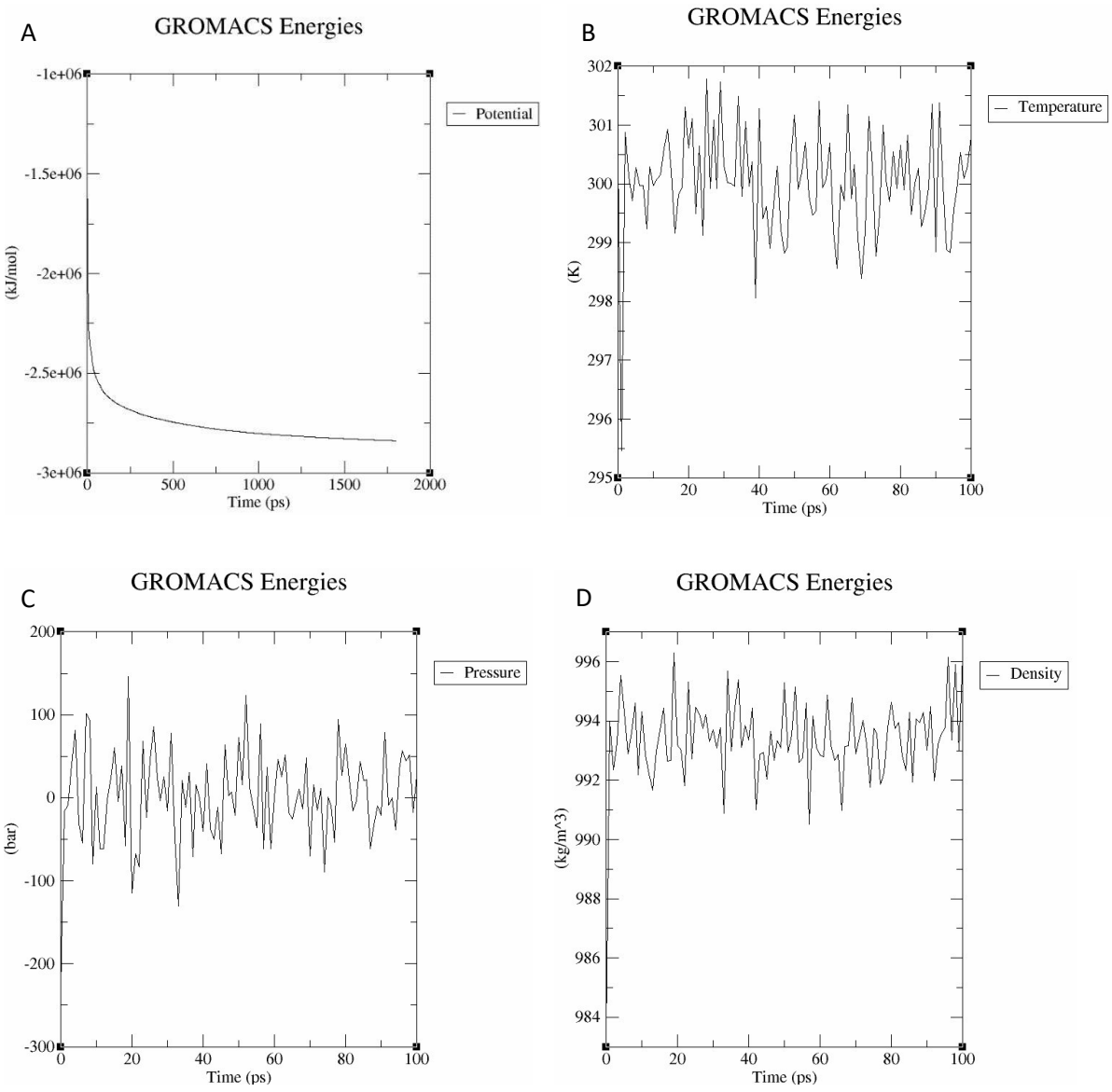

Figura 15.- Gráficas generadas durante el proceso de minimización de energía y equilibración de la estructura del constructo vacunal I. Gráfica del potencial de energía (A), temperatura (B), presión (C) y densidad del sistema (D).

La minimización de energía del constructo vacunal II se llevó a cabo durante 1882 pasos donde la fuerza alcanzó <1000 kJ/mol. El potencial de energía fue de -1.8259142e+06 kJ/mol, mientras que el potencial de energía promedio del sistema durante la minimización de la energía fue -1.77528e+06 kJ/mol con una deriva total de -175465 kJ/mol (Figura 16A). La temperatura promedio fue 299.713 K con una deriva total de 1.3995 K (Figura 16B). La presión promedio fue 0.558434 bar con una deriva total de 2.79842 bar (Figura 16C), mientras que la densidad promedio fue 999.31 kg/m³ con una deriva total de 0.188659 kg/m³ (Figura 16D).

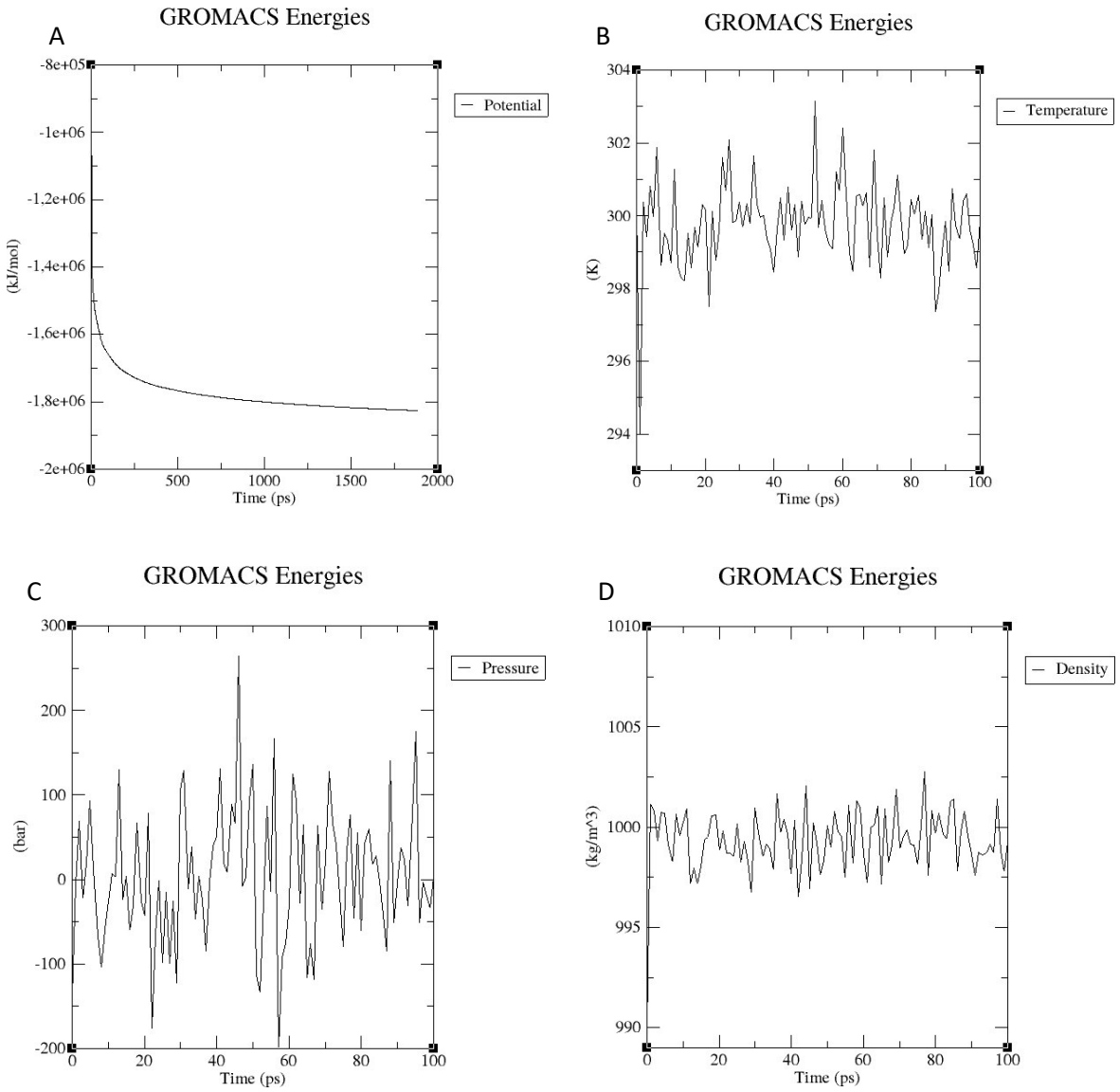

Figura 16.- Gráficas generadas durante el proceso de minimización de energía y equilibración de la estructura del constructo vacunal II. Gráfica del potencial de energía (A), temperatura (B), presión (C) y densidad del sistema (D).

El análisis de trayectoria se realizó luego de 40 ns de tiempo de simulación. El gráfico RMSD reveló un comportamiento estable del constructo vacunal II a partir de los 30 ns (Figura 17A). Este comportamiento no se observó en el caso del constructo vacunal I (Figura 17B).

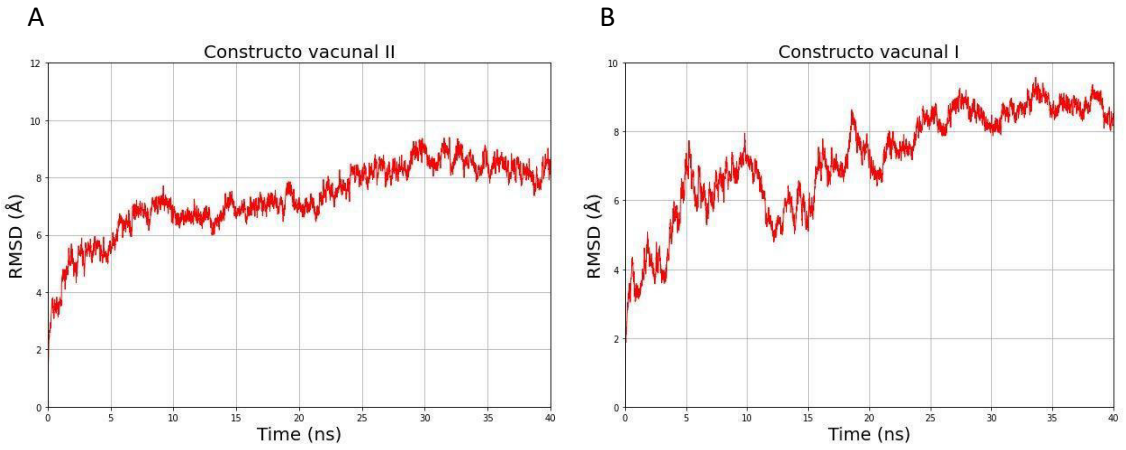

Figura 17.- Gráfica *root-mean-square-deviation* (RMSD) del constructo vacunal II (A) y I (B).

10. *Docking* Molecular con TLR-4/MD2

HADDOCK agrupó 145 estructuras en 9 *clusters* que representa 72% de modelos refinados con agua generados por HADDOCK. El *cluster* con la puntuación más baja de HADDOCK es el más confiable entre todos los *clusters*. Un modelo representativo de este *cluster* fue refinado con HADDOCK Refinement Interface. El HADDOCK Refinement Interface agrupó 20 estructuras en 1 *cluster*, que representa 100% de modelos refinados con agua generados por HADDOCK. Las estadísticas del *cluster* refinado se muestran en la tabla 7. Un total de 10 residuos del constructo vacunal II interactuaron con 11 residuos del TLR4/MD2 (Figura 18A). El constructo vacunal II formó un total de 5 puentes hidrógeno [Cadena A (TLR4-MD2)- B (constructo vacunal II); 92-324, 101-314, 101-318, 101-318, 118-322] con el TLR4/MD2. Solo los residuos de MD2 estuvieron involucrados en la interacción con el constructo vacunal II (Figura 18B).

Tabla 6.- Estadísticas del mejor cluster del docking constructo vacunal II-TLR4/MD2.

Parámetros	Valores
Puntaje HADDOCK	-99.3 +/- 2.6
Tamaño de *cluster*	20
RMSD de la estructura general de menor energía	0.3 +/- 0.2
Energía Van der Waals	-41.1 +/- 2.9
Energía electrostática	-194.3 +/- 9.5
Energía de desolvatación	-19.3 +/- 3.7
Restraints violation energy	0.0 +/- 0.00
Buried Surface Area	1314.4 +/- 30.2
z-score	0.0

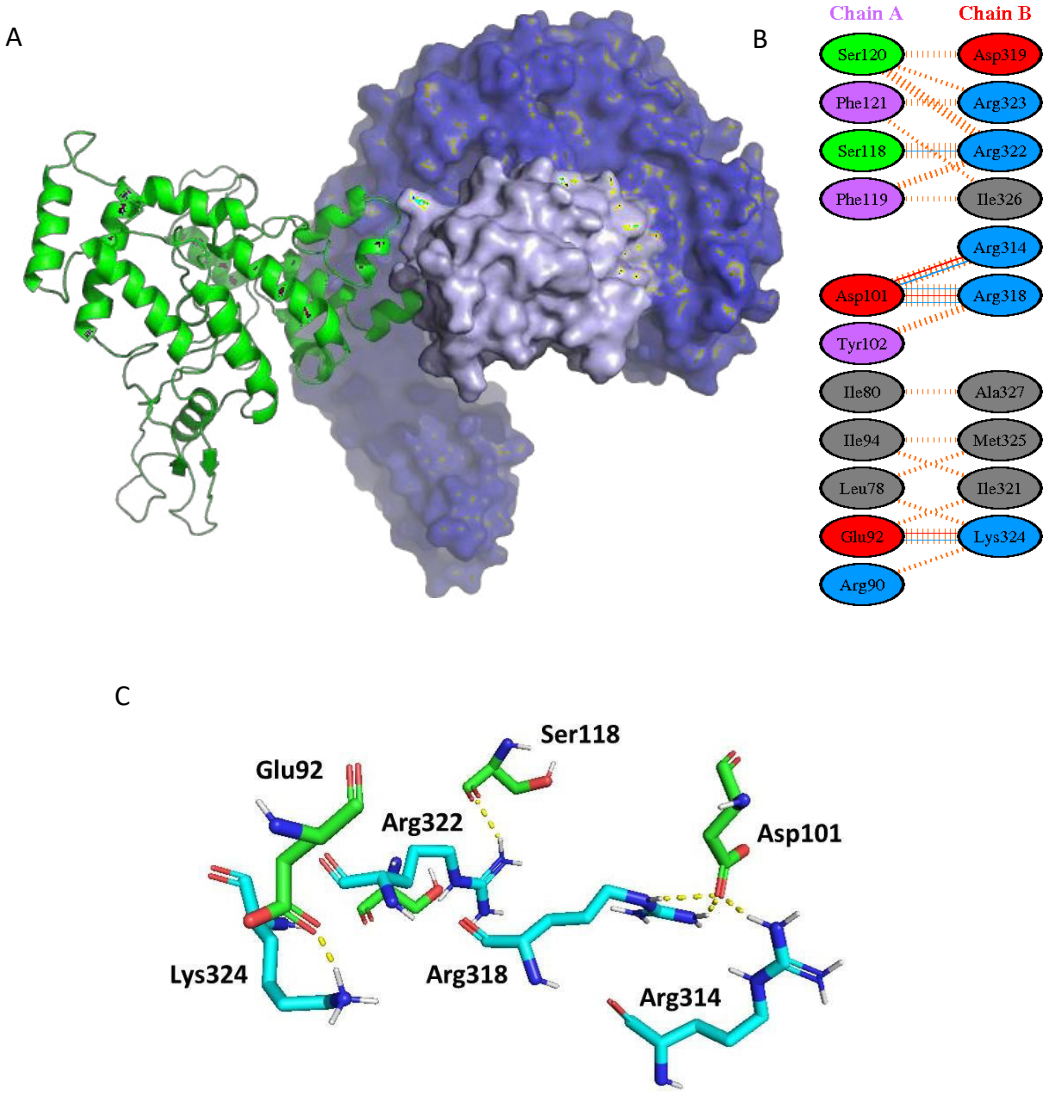

Figura 18.- Complejo de docking constructo vacunal II-TLR4/MD2. (A) TLR4/MD2 (azul y azul claro) y constructo vacunal II (verde). (B) Mapeado de las interacciones entre los residuos del TLR4/MD2 (chain A) y del constructo vacunal II (chain B). (C) Vista detallada de los puentes hidrógenos formados. Residuos del TLR4/MD2 (celeste) y residuos del constructo vacunal II (verde). Puentes salinos (líneas rojas), puentes hidrógeno (líneas celestes) e interacciones no covalentes (líneas anaranjadas).

4. Discusión

En el presente estudio se realizó un análisis inmunoinformático del proteoma de *B. bacilliformis* con el fin de seleccionar los mejores epítopos para el diseño de un constructo vacunal contra el organismo causal de la enfermedad de Carrión.

El enfoque inmunoinformático en el desarrollo de candidatos vacunales, además de mejorar los problemas de costo, tiempo y seguridad cuando son comparados con los enfoques tradicionales, permite el desarrollo de vacunas multiepitópicas. Este tipo de vacunas presentan las ventajas de asegurar una respuesta inmune dirigida, evitando así las posibilidades de reacciones alérgicas (Chauhan et al., 2019), y amplia al estar compuestos tanto por epítopos de células T (células TCD

4 y TCD8) como epítopes de células B (Sanches et al., 2021). Además, son de fácil síntesis y estables en diversas condiciones de almacenamiento (Slingluf, 2011). Diferentes estudios han desarrollado vacunas multiepitópicas contra el cáncer (Abdelmoneima et al., 2020) e infecciones virales (Kar et al., 2020). También se han diseñado dichos tipos de vacunas efectivas *in silico* a partir de antígenos de bacterias patógenas como *Helicobacter pylori* (Khan et al., 2019), *Klebsiella pneumoniae* (Dar et al., 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (Solanki et al., 2019) y *Shigella spp*. (Goumari et al., 2018). Esto, sumado a la necesidad del desarrollo de una vacuna efectiva contra *B.bacilliformis*, propició el enfoque de este estudio en el diseño de un candidato vacunal multiepitópico.

La primera parte de este trabajo consistió en la predicción de los epítopos de las proteínas totales de *B. bacilliformis* KC583. Se realizó la predicción de epítopos de células T correspondientes a los alelos más frecuentes de la población mundial (grupo A) (Kumar et al., 2020; Paul et al., 2015) y de Perú, Ecuador y Colombia (grupo B) (Requena et al., 2020). Este último grupo se tomó en cuenta dado que dichos alelos corresponden a los países en los cuales la enfermedad de Carrión es endémica (Nunura, 2012). Luego, a partir de los epítopos totales, se seleccionaron aquellos epítopos experimentales y epítopos *nested*. Este primer grupo se consideró con el fin de superar las limitaciones de las predicciones computacionales. Se tomaron en cuenta epítopos *nested* dado que se ha reportado esta estrategia en estudios de diseño de vacunas contra VPH (Kaliamurthi et al., 2018) y SARS-CoV-2 (Smith et al., 2020); reforzando así la idea que epítopos con especificidades duales de unión a MHC I y II puedan ser utilizados también como una estrategia para el desarrollo de vacunas contra otros patógenos. Además, el empleo de epítopos *nested* resulta eficaz para mantener una pequeña longitud del constructo vacunal final (Abdulla et al., 2019).

A partir de los epítopos *nested* totales, se seleccionaron aquellos que correspondían a proteínas de membrana externa dado que estas son de mayor accesibilidad al sistema inmune (Kumar y Nimesh; 2021). Además, múltiples adhesinas de bacterias gram negativas, incluidas del género *Bartonella,* han sido reportadas como posibles blancos vacunales (Thibau et al., 2019). También se seleccionaron epítopos *nested* que correspondían a proteínas asociadas a virulencia ya que son esenciales para la patogénesis de los microorganismos (Kumar y Nimesh; 2021); además, existen múltiples proteínas involucradas en la interacción entre *B. bacilliformis* y el humano hospedero que han sido registradas como potenciales candidatas vacunales (Henriquez-Camacho et al., 2015).

Además de la generación de una respuesta inmune celular, es importante la generación de una respuesta inmune humoral para asegurar la eficacia de una vacuna. Por lo que, al igual que un trabajo previo, se predijeron tanto epítopos de células T como de células B (Gul et al., 2020). Los epítopos de células B predichos fueron correspondientes a proteínas membrana externa y virulentas. Luego, tanto los epítopos *nested* de células T correspondientes a proteínas de membrana externa, asociadas a virulencia y experimentales como los epítopos de células B correspondientes a proteínas de membrana externa y asociadas a virulencia, se evaluaron. El primer criterio de selección de los epítopos *nested* de células T fue alta promiscuidadya que epítopos con unión a una alta cantidad alelos incrementan la cobertura poblacional de la vacuna que los contenga (Nezafat et al., 2016). Adicionalmente, se seleccionaron epítopos que no tuvieran homología con el proteoma humano y murino para evitar posibles respuestas autoinmunes en humanos y en futuros ensayos clínicos en ratones. También se evaluó si los epítopos generaban alguna reacción alérgica y si eran tóxicos para asegurar la seguridad de la vacuna diseñada. El último criterio para la selección de los

epítopos finales fue la conservación de estos entre todas las cepas de *B. bacilliformis* registradas en el NCBI. Se esperó seleccionar los epítopos que tuvieran una conservación del 100% entre todas las cepas; sin embargo, en el caso de epítopos de proteínas de membrana externa, se decidió considerar los epítopos que tuvieran el ≥ 94.12% (conservación del 100% entre 16/17 de las cepas) ya que se observaron cambios aminoacídicos de algunos péptidos con respecto a la cepa Ver097, considerada como una posible subespecie de *B. bacilliformis* (Paul et al., 2016). Estos mismos filtros se han empleado en trabajos previos con el fin de seleccionar los mejores epítopos para la construcción de una vacuna multiepitópica contra *B. bacilliformis* (Padilla et al., 2019; Gul et al., 2020). Sin embargo, cabe resaltar que previamente no se ha considerado la no homología con el proteoma murino y la alta promiscuidad de los epítopos.

En relación con los epítopos finales, ninguno de estos ha sido previamente reportado en otros estudios; sin embargo, cabe resaltar que la mayoría de las proteínas asociadas a virulencia correspondientes a los epítopos finales son relacionadas al aparato flagelar lo que coincide con trabajos previos que indican otras proteínas relacionadas al aparato flagelar como potenciales candidatos vacunales (Gul et al., 2020; Khan et al., 2020). Además, se han reportado un epítopo de la proteína autotransportadora de membrana exterior (A1UTU0) lo que coincide con un trabajo previo que registra dicha proteína como un antígeno inmunodominante validado experimentalmente (Dichter et al., 2021).

A partir de los epítopos finales se formaron dos constructos vacunales, cuyos epítopos fueron concatenados empleando *linkers*. Los *linkers* juegan un rol crucial en la expresión, estabilidad y plegado adecuado de proteínas (Wriggers et al., 2005). Además, previenen la formación de nuevos epítopos y facilitan el procesamiento inmune del antígeno por lo que los *linkers* se emplearon para diseñar una estable y bioactiva vacuna multiepitópica (Saadi et al., 2017). Otro elemento importante en un constructo vacunal son los adyuvantes. Estos se emplean con el fin de mejorar la inmunogenicidad del constructo vacunal y asegurar la liberación lenta del mismo (Goumari et al: 2019). Debido a que los TLRs son mediadores tempranos de la respuesta inmune innata contra patógenos, los agonistas de TLRs son efectivos como adyuvantes vacunales (Slingluff, 2011). Además, son los tipos más comunes de adyuvantes utilizados en vacunas multiepitópicas (Goumari et al., 2019). En trabajos previos relacionados al desarrollo de vacunas multiepitópicas contra bacterias patógenas gram negativas se ha empleado β-defensinas (Khan et al., 2019), la subunidad β de la toxina del cólera (Dar et al, 2019) y la proteína ribosómica 50S L7/L12 (Gul et al., 2020) como adyuvantes. En el presente estudio se empleó la β-defensina humana de longitud de 45 aminoácidos debido tanto a su actividad antimicrobiana como inmunomoduladora (Hoover et al., 2020).

La evaluación de los constructos vacunales se realizó con diferentes programas y/o servidores inmunoinformáticos y los mismos revelaron la seguridad (no potencialmente alérgica ni tóxica) y efectividad (potencialmente antigénica) de ambos constructos. Los análisis físicoquímicos indicaron que ambos constructos son estables, hidrofílicos y de naturaleza ácida. Además, no presentan hélices transmembrana ni péptido señal, dos características no deseadas en una vacuna (Kar et al., 2020). Al presentar propiedades fisicoquímicas adecuadas se procedió con la predicción de la estructura secundaria y terciaria de ambos constructos vacunales. Los modelos 3D generados fueron posteriormente refinados y evaluados usando el plot de Ramachandran. Se observó una mejora de la calidad de las estructuras 3D de ambos constructos después del refinamiento. Los mejores

modelos de ambos constructos fueron adicionalmente validados por ERRAT y Prosa-web. La puntuación calculada para ambos modelos según ERRAT fue alta y el z-score evaluado por Prosa-web indicaba que ambos constructos se encuentran en el rango de z-scores de estructuras ya determinadas resueltas por experimentos cristalográficos de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) (Wiederstein y Sippl, 2007).

Los resultados de simulación de dinámica molecular de 40 ns indicaron un comportamiento estable del constructo vacunal II; sin embargo, no se observó dicho comportamiento en el caso del constructo vacunal I. Por consiguiente, el constructo vacunal II fue seleccionado para el docking molecular con el TLR4/MD2. El análisis de docking reveló puentes salinos, interacciones no covalentes y puentes hidrógeno que se formaron durante la interacción. La distancia de los puentes hidrógeno entre la vacuna y el TLR4/MD2 se encontraban en el rango de 2-3 Å, indicando una fuerte interacción entre el constructo vacunal diseñado y el TLR4/MD2 (Minch, 1999).

5. Conclusiones

En el presente estudio, empleando una metodología basada en Inmunoinformática se han seleccionado minuciosamente epítopos con potencial capacidad de inducir una respuesta inmune celular y humoral.

Se han logrado conformar dos constructos vacunales contra *B. bacilliformis* basados en dichos epítopos.

El constructo vacunal II mostró más estabilidad durante la simulación de dinámica molecular por lo cual fue seleccionado.

El docking molecular con el TLR4/MD2 validó el empleo del constructo vacunal II como un potencial candidato a vacuna contra *B. bacilliformis*.

6. Recomendaciones

Se requiere una posterior validación experimental sintetizando el constructo vacunal II e inoculando en animales de experimentación para determinar la respuesta inmune humoral.

7. Referencias bibliográficas

Abdelmoneim, A. H., Mustafa, M. I., Abdelmageed, M. I., Murshed, N. S., Dawoud, E. dk., Ahmed, E. M., Eldein, R. M. K., Elfadol, N. M., Sati, A. O. M., & Makhawi, A. M. (2020). Immunoinformatics design of multiepitopes peptide-based universal cancer vaccine using matrix metalloproteinase-9 protein as a target. Immunological Medicine, 44(1), 1–18. https://doi.org/10.1080/25785826.2020.1794165

Abdulla, F., Adhikari, U. K., & Uddin, M. K. (2019). Exploring T & B-cell epitopes and designing multi-epitope subunit vaccine targeting integration step of HIV-1 lifecycle using immunoinformatics approach. Microbial Pathogenesis, 137. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.103791

Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindah, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX, 1–2, 19–25. https://doi.org/10.1016/J.SOFTX.2015.06.001

Acosta, O., Solano, L., Escobar, J., Fernández, M., & Solano, C. (2013). Enfoque genético evolutivo de la enfermedad de Carrión. Polimorfismos de los grupos

sanguíneos MN, Ss, Diego, Duffy y fases clínicas en zonas endémicas de Bagua, Amazonas. Anales de La Facultad de Medicina, 72(2), 101. https://doi.org/10.15381/anales.v72i2.989

Aleman Mazulis, M. (2017). Desarrollo de una prueba inmunocromatográfica para la detección rápida de *Bartonella bacilliformis* [Tesis de Licenciatura, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas]. Repositorio académico-UPC.

Alexander, B. (1995). A Review of Bartonellosis in Ecuador and Colombia *. The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene, 52(4), 354-359. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.52.354

Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. Nature Biotechnology, 37(4), 420–423. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z

Battisti, J., & Minnick, M. (1999). Development of a System for Genetic Manipulation of *Bartonella bacilliformis*. Applied And Environmental Microbiology, 65(8), 3441-3448. d https://doi.org/10.1128/aem.65.8.3441-3448.1999

Breitschwerdt, E. B. (2014). Bartonellosis: One health perspectives for an emerging infectious disease. ILAR Journal, 55(1), 46–58. https://doi.org/10.1093/ilar/ilu015

Bui, H. H., Sidney, J., Li, W., Fusseder, N., & Sette, A. (2007). Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. BMC Bioinformatics, 8. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-361

C, C., & TO, Y. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. Protein Science: A Publication of the Protein Society, 2(9), 1511–1519. https://doi.org/10.1002/PRO.5560020916

Carroll, J., Coleman, S., Smitherman, L., & Minnick, M. (2000). Hemin-Binding Surface Protein from Bartonella quintana. Infection And Immunity, 68(12), 6750-6757. https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6750-6757.2000

Centro Nacional de Epidemiología, P. y C. de E. (2021). Boletín epidemiológico del Perú 2021. https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/wp-content/uploads/2021/04/boletin_202109.pdf

Chauhan, V., Rungta, T., Goyal, K., & Singh, M. P. (2019). Designing a multi-epitope based vaccine to combat Kaposi Sarcoma utilizing immunoinformatics approach. Scientific Reports 2019 9:1, 9(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39299-8

Chen, H., Mochida, A., Ching, P., Chao, C., & Ching, W. (2019). A Highly Sensitive Quantitative PCR for the Detection of *Bartonella bacilliformis* by Targeting a Multiple-Copy DNA Segment. Archives Of Clinical Microbiology, 10(2). https://doi.org/10.36648/1989-8436.10.2.91

Coleman, S., & Minnick, M. (2001). Establishing a Direct Role for the *Bartonella bacilliformis* Invasion-Associated Locus B (IalB) Protein in Human Erythrocyte Parasitism. Infection And Immunity, 69(7), 4373-4381. https://doi.org/10.1128/iai.69.7.4373-4381.2001

Coleman, S., & Minnick, M. (2003). Differential expression of the invasion-associated locus B (ialB) gene of Bartonella bacilliformis in response to environmental cues. Microbial Pathogenesis, 34(4), 179-186. https://doi.org/10.1016/s0882-4010(03)00005-6

Conyers, G., & Bessman, M. (1999). The Gene, ialA, Associated with the Invasion of Human Erythrocytes by *Bartonella bacilliformis*, Designates a Nudix Hydrolase Active on Dinucleoside 5′-Polyphosphates. Journal Of Biological Chemistry, 274(3), 1203-1206. https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1203

Dabo, S., Confer, A., Anderson, B., & Gupta, S. (2006). *Bartonella henselae* Pap31, an Extracellular Matrix Adhesin, Binds the Fibronectin Repeat III13 Module. Infection And Immunity, 74(5), 2513-2521. https://doi.org/10.1128/iai.74.5.2513-2521.2006

Dar, H. A., Zaheer, T., Shehroz, M., Ullah, N., Naz, K., Muhammad, S. A., Zhang, T., & Ali, A. (2019). Immunoinformatics-Aided Design and Evaluation of a Potential Multi-Epitope Vaccine against *Klebsiella Pneumoniae*. Vaccines, 7(3). https://doi.org/10.3390/VACCINES7030088

Del Valle Mendoza, J., Silva Caso, W., Tinco Valdez, C., Pons, M., del Valle, L., & Oré, V. et al. (2014). Diagnosis of Carrion's Disease by Direct Blood PCR in Thin Blood Smear Negative Samples. Plos ONE, 9(3), e92283. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092283

Dichter, A. A., Schultze, T. G., Wenigmann, A., Ballhorn, W., Latz, A., Schlüfter, E., Ventosilla, P., Guerra Allison, H., Ugarte-Gil, C., Tsukayama, P., & Kempf, V. A. J. (2021). Identification of immunodominant *Bartonella bacilliformis* proteins: a combined in-silico and serology approach. The Lancet Microbe. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00184-1

Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v.2 - A server for in silico prediction of allergens. Journal of Molecular Modeling, 20(6). https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5

Doytchinova, I., & Flower, D. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics, 8(1). https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4

Ferrara, F., Di Niro, R., D'Angelo, S., Busetti, M., Marzari, R., Not, T., & Sblattero, D. (2014). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Bartonella henselae* infection detection. Letters In Applied Microbiology, 59(3), 253-262. https://doi.org/10.1111/lam.12286

Flores Aguilar, L. E. (2008). Estudios moleculares en *Bartonella bacilliformis* para el control de la enfermedad de Carrión. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio UNMSM.

Garcia-Quintanilla, M., Dichter, A., Guerra, H., & Kempf, V. (2019). Carrion's disease: more than a neglected disease. Parasites & Vectors, 12(1). https://doi.org/10.1186/s13071-019-3390-2

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In The Proteomics Protocols Handbook. http://www.expasy.org/tools/.

Gomes, C., Martinez-Puchol, S., Pons, M., Bazán, J., Tinco, C., del Valle, J., & Ruiz, J. (2016b). Evaluation of PCR Approaches for Detection of *Bartonella bacilliformis* in Blood Samples. PLOS Neglected Tropical Diseases, 10(3), e0004529. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004529

Gomes, C., Pons, M., del Valle Mendoza, J., & Ruiz, J. (2016a). Carrion's disease: an eradicable illness? Infectious Diseases Of Poverty, 5(1). https://doi.org/10.1186/s40249-016-0197-7

Gonzales C, Maguiña C, Heras F & Conde-Salazar L. (2007). Bartonelosis (Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana): ¿Enfermedad ocupacional?. Medicina Y Seguridad Del Trabajo, 53(209). https://doi.org/10.4321/s0465-546x2007000400006

Goumari, M. M., Farhani, I., Nezafat, N., & Mahmoodi, S. (2019). Multi-Epitope Vaccines (MEVs), as a Novel Strategy Against Infectious Diseases. Current Proteomics, 17(5), 354–364. https://doi.org/10.2174/1570164617666190919120140

Gul, H., Ali, S. S., Saleem, S., Khan, S., Khan, J., Wadood, A., Rehman, A. U., Ullah, Z., Ali, S., Khan, H., Hussain, Z., Akbar, F., Khan, A., & Wei, D. Q. (2020). Subtractive proteomics and immunoinformatics approaches to explore *Bartonella bacilliformis* proteome (virulence factors) to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine. Infection, Genetics and Evolution, 85, 104551. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104551

Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., & Raghava, G. P. S. (2013). In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. PLoS ONE, 8(9), e73957. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957

Harms, A., & Dehio, C. (2012). Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of *Bartonella spp*. Clinical Microbiology Reviews, 25(1), 42-78. https://doi.org/10.1128/cmr.05009-11

Henriquez-Camacho, C., Ventosilla, P., Minnick, M., Ruiz, J., & Maguiña, C. (2015). Proteins of *Bartonella bacilliformis*: Candidates for Vaccine Development. International Journal Of Peptides, 2015, 1-5. https://doi.org/10.1155/2015/702784

Hoover, D. M., Wu, Z., Tucker, K., Lu, W., & Lubkowski, J. (2003). Antimicrobial characterization of human β-defensin 3 derivatives. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(9), 2804–2809. https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2804-2809.2003

Howe C, Hertig M (1943) Prophylactic Immunization against Carrion's Disease. J Immunol 47: 471–82.

Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. Nucleic Acids Research, 45(W1), W24–W29. https://doi.org/10.1093/nar/gkx346

Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. Journal of Molecular Biology, 292(2), 195–202. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3091

Jurtz, V., Paul, S., Andreatta, M., Marcatili, P., Peters, B., & Nielsen, M. (2017). NetMHCpan-4.0: Improved Peptide–MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. The Journal of Immunology, 199(9), 3360–3368. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700893

Kaliamurthi, S., Kaushik, C., Gu, K.-R., & Wei, D.-Q. (2018). Designing of cD8 + and cD8 +-overlapped cD4 + epitope vaccine by targeting late and early proteins of human papillomavirus. Biologics: Targets and Therapy, 12, 12–107. https://doi.org/10.2147/BTT.S177901

Kar, T., Narsaria, U., Basak, S., Deb, D., Castiglione, F., Mueller, D. M., & Srivastava, A. P. (2020). A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. Scientific Reports 2020 10:1, 10(1), 1–24. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67749-1

Kelly, T. M., Padmalayam, I., & Baumstark, B. R. (1998). Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among Bartonella species. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 5(6), 766–772.

Khan, M., Mahmud, A., Iqbal, M., & Hasan, M. (2019). Subtractive Genomic Analysis for Identification of Novel Drug Targets and Vaccine Candidates against *Bartonella bacilliformis* subsp. Ver097. https://doi.org/10.1101/731570

Kreier, J., & Ristic, M. (1981). The Biology of Hemotrophic Bacteria. Annual Review Of Microbiology, 35(1), 325-338. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.35.100181.001545

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. Journal of Molecular Biology, 305(3), 567–580. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315

Kumar, T., & Nimesh, S. (2021). The Design and Development of Novel Drugs and Vaccines: Principles and Protocols. In The Design and Development of Novel Drugs and Vaccines: Principles and Protocols (1st ed., pp. 93–94). Academic Press.

Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. Protein Science, 27(1), 129–134. https://doi.org/10.1002/pro.3289

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography, 26(2), 283–291. https://doi.org/10.1107/s0021889892009944

Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, 78(8), 1950–1958. https://doi.org/10.1002/prot.22711

Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. Nucleic Acids Research, 47(D1), D687–D692. https://doi.org/10.1093/nar/gky1080

M, S., A, K., & HR, N. (2017). Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 51, 227–234. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2017.04.009

Maguiña, C., & Gotuzzo, E. (2000). BARTONELLOSIS. Infectious Disease Clinics Of North America, 14(1), 1-22. https://doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70215-4

Maguiña, C., Garcia, P., Gotuzzo, E., Cordero, L., & Spach, D. (2001). Bartonellosis (Carrión's Disease) in the Modern Era. Clinical Infectious Diseases, 33(6), 772-779. https://doi.org/10.1086/322614

Minnick, M., Anderson, B., Lima, A., Battisti, J., Lawyer, P., & Birtles, R. (2014). Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonelloses Unique to South America. Plos Neglected Tropical Diseases, 8(7), e2919. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002919

Minch, M. J. (1999). An Introduction to Hydrogen Bonding (Jeffrey, George A.). Journal of Chemical Education, 76(6), 759. https://doi.org/10.1021/ED076P759.1

Minnick, M., Sappington, K., Smitherman, L., Andersson, S., Karlberg, O., & Carroll, J. (2003a). Five-Member Gene Family of Bartonella quintana. Infection And Immunity, 71(2), 814-821. https://doi.org/10.1128/iai.71.2.814-821.2003

Minnick, M., Smitherman, L., & Samuels, D. (2003b). Mitogenic Effect of *Bartonella bacilliformis* on Human Vascular Endothelial Cells and Involvement of GroEL. Infection And Immunity, 71(12), 6933-6942. https://doi.org/10.1128/iai.71.12.6933-6942.2003

Mitchell, S., & Minnick, M. (1995). Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. Infection And Immunity, 63(4), 1552-1562. https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1552-1562.1995

N, N., Z, K., M, E., M, M., S, Z., & Y, G. (2016). Designing an efficient multi-epitope peptide vaccine against *Vibrio cholerae* via combined immunoinformatics and protein interaction based approaches. Computational Biology and Chemistry, 62, 82–95. https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2016.04.006

Nunura, J. (2012). La Vigilancia Epidemiológica en Salud Pública de la enfermedad de Carrión. Bol Epidemiol, 21(15), 245-246.

O'Rourke, F., Schmidgen, T., Kaiser, P., Linke, D., & Kempf, V. (2011). Adhesins of *Bartonella spp*. Advances In Experimental Medicine And Biology, 51-70. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_4

Ordaya, E., & Maguiña, C. (2020). Bartonellosis: Carrion's Disease and Other *Bartonella* Infections. In E. Ryan, T. Solomon, T. Endy, D. Hill & N. Aronson, Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 604-607. Elsevier.

Padilla Rojas, C., Lope Pari, P., Santos Solis, L., Osorio Mogollón, C., Inga Angulo, L., & Bailon Calderon, H. et al. (2019). Diseño y evaluación de una proteína multiepitópica como candidata para vacuna contra la enfermedad de Carrión. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4430

Padmalayam, I., Anderson, B., Kron, M., Kelly, T., & Baumstark, B. (1997). The 75-kilodalton antigen of *Bartonella bacilliformis* is a structural homolog of the cell division protein FtsZ. Journal Of Bacteriology, 179(14), 4545-4552. https://doi.org/10.1128/jb.179.14.4545-4552.1997

Pan, X., Zuallaert, J., Wang, X., Shen, H. Bin, Campos, E. P., Marushchak, D. O., & De Neve, W. (2020). ToxDL: Deep learning using primary structure and domain embeddings for assessing protein toxicity. Bioinformatics, 36(21), 5159–5168. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa656

Paul, S., Minnick, M. F., & Chattopadhyay, S. (2016). Mutation-Driven Divergence

and Convergence Indicate Adaptive Evolution of the Intracellular Human-Restricted Pathogen, Bartonella bacilliformis. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(5). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004712

Requena, D., Médico, A., Chacón, R. D., Ramírez, M., & Marín-Sánchez, O. (2020). Identification of Novel Candidate Epitopes on SARS-CoV-2 Proteins for South America: A Review of HLA Frequencies by Country. Frontiers in Immunology, 0, 2008. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.02008

Reynisson, B., Barra, C., Kaabinejadian, S., Hildebrand, W. H., Peters, B., & Nielsen, M. (2020). Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. Journal of Proteome Research, 19(6), 2304–2315. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00874

S, R., R, V., J, T., M, T., R, S., J, P., D, K., E, K., F, D., O, L., L, K., W, S., BH, K., R, D., NV, G., & D, B. (2009). Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. Proteins, 77 Suppl 9(0 9), 89–99. https://doi.org/10.1002/PROT.22540

Sanches, R. C. O., Tiwari, S., Ferreira, L. C. G., Oliveira, F. M., Lopes, M. D., Passos, M. J. F., Maia, E. H. B., Taranto, A. G., Kato, R., Azevedo, V. A. C., & Lopes, D. O. (2021). Immunoinformatics Design of Multi-Epitope Peptide-Based Vaccine Against *Schistosoma mansoni* Using Transmembrane Proteins as a Target. Frontiers in Immunology, 12, 621706. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621706

Sanchez Clemente, N., Ugarte-Gil, C., Solórzano, N., Maguiña, C., Pachas, P., & Blazes, D. et al. (2012). *Bartonella bacilliformis*: A Systematic Review of the Literature to Guide the Research Agenda for Elimination. Plos Neglected Tropical Diseases, 6(10), e1819. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001819

Scherer, D., DeBuron-Connors, I., & Minnick, M. (1993). Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of antiflagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. Infection And Immunity, 61(12), 4962-4971. https://doi.org/10.1128/iai.61.12.4962-4971.1993

Silva-Díaz, H., Iglesias-Osores, S., & Failoc-Rojas, V. (2019). Diagnóstico de *Bartonella bacilliformis* con frotis de sangre periférica: Utilidad en países con bajos recursos. Revista Chilena De Infectología, 36(1). http://.doi.org/10.4067/S0716-10182019000100115

Slingluff, C. L., & Jr. (2011). The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination? Cancer Journal (Sudbury, Mass.), 17(5), 343. https://doi.org/10.1097/PPO.0B013E318233E5B2

Smith, C. C., Olsen, K. S., Gentry, K. M., Sambade, M., Beck, W., Garness, J., Entwistle, S., Willis, C., Vensko, S., Woods, A., Fini, M., Carpenter, B., Routh, E., Kodysh, J., O'Donnell, T., Haber, C., Heiss, K., Stadler, V., Garrison, E., … Rubinsteyn, A. (2021). Landscape and selection of vaccine epitopes in SARS-CoV-2. Genome Medicine 2021 13:1, 13(1), 1–23. https://doi.org/10.1186/S13073-021-00910-1

Smitherman, L. (2005). Bartonella bacilliformis GroEL: Effect on Growth of Human Vascular Endothelial Cells in Infected Cocultures. Annals Of The New York Academy Of Sciences, 1063(1), 286-298. https://doi.org/10.1196/annals.1355.046

Solanki, V., Tiwari, M., & Tiwari, V. (2019). Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports, 9(1). https://doi.org/10.1038/S41598-019-41496-4

Taye, A. (2005). Production of Recombinant Protein Pap31 and Its Application for the Diagnosis of *Bartonella bacilliformis* Infection. Annals Of The New York Academy Of Sciences, 1063(1), 280-285. https://doi.org/10.1196/annals.1355.045

Tejada, Abelardo, Vizcarra, Hugo, Pérez, Jorge, Cáceres, Abraham, Quispe, Jaime, Pinto, José, Zorrilla, Víctor, Suárez, Ana María, & Picón, Luis. (2003). Estudio clínico epidemiológico de bartonelosis humana en el valle del Monzón, Huamalíes, Huánuco. Anales de la Facultad de Medicina, 64(4), 211-217.

Thibau, A., Dichter, A. A., Vaca, D. J., Linke, D., Goldman, A., & Kempf, V. A. J. (2019). Immunogenicity of trimeric autotransporter adhesins and their potential as vaccine targets. Medical Microbiology and Immunology. https://doi.org/10.1007/s00430-019-00649-y

Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastritis, P. L., Karaca, E., Melquiond, A. S. J., Van Dijk, M., De Vries, S. J., & Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. Journal of Molecular Biology, 428(4), 720–725. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014

W, W., S, C., & PA, J. (2005). Control of protein functional dynamics by peptide linkers. Biopolymers, 80(6), 736–746. https://doi.org/10.1002/BIP.20291

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Research, 35, 407–410. https://doi.org/10.1093/nar/gkm290

Xu, D., & Zhang, Y. (2011). Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization. Biophysical Journal, 101(10), 2525–2534. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024

Yon C. (2018). Situación epidemiológica de la enfermedad de Carrión en el Perú, 2018. Boletín Epidemiológico del Perú, 27 (52), 1255-1257.

Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Cenk Sahinalp, S., Ester, M., Foster, L. J., & Brinkman, F. S. L. (2010). PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. Bioinformatics, 26(13), 1608–1615. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249

Zeaiter, Z., Fournier, P., Ogata, H., & Raoult, D. (2002). Phylogenetic classification of Bartonella species by comparing groEL sequences. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 52(1), 165-171. https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-165

Zorrilla, V., Vásquez, G., Espada, L., & Ramírez, P. (2017). Vectores de la leishmaniasis tegumentaria y la Enfermedad de Carrión en el Perú: una actualización. Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública, 34(3), 485. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2398

8. Anexos

Anexo 1. Resultados del *plot* de Ramachandran de los modelos del constructo vacunal I antes del refinamiento de sus estructuras.

Modelo	1	2	3	4	5
Regiones más favorecidas	230 (90.9%)	234 (92.5%)	231 (91.3%)	231 (91.3%)	229 (90.5%)
Regiones permitidas adicionales	23 (9.1%)	19 (7.5%)	22 (8.7%)	22 (8.7%)	23 (9.1%)
Regiones generosamente permitidas	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)
Regiones no permitidas	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Anexo 2. Resultados del *plot* de Ramachandran de los modelos del constructo vacunal I después del refinamiento de sus estructuras.

Modelo	1	2	3	4	5
Regiones más favorecidas	235 (92.9%)	241 (95.3%)	247 (97.6%)	239 (94.5%)	231 (91.3%)
Regiones permitidas adicionales	16 (6.3%)	12 (4.7%)	6 (2.4%)	12 (4.7%)	20 (7.9%)
Regiones generosamente permitidas	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	2 (0.8%)
Regiones no permitidas	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)

Anexo 3. Resultados del *plot* de Ramachandran de los modelos del constructo vacunal II antes del refinamiento de sus estructuras.

Modelo	1	2	3	4	5
Regiones más favorecidas	236 (91.8%)	243 (94.6%)	242 (94.2%)	243 (94.6%)	233 (90.7%)
Regiones permitidas adicionales	21 (8.2%)	14 (5.4%)	14 (5.4%)	14 (5.4%)	24 (9.3%)
Regiones generosamente permitidas	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Regiones no permitidas	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Anexo 4. Resultados del *plot* de Ramachandran de los modelos del constructo vacunal II después del refinamiento de sus estructuras.

Modelo	1	2	3	4	5
Regiones más favorecidas	239 (93%)	248 (96.5%)	243 (94.6%)	246 (95.7%)	243 (94.6%)
Regiones permitidas adicionales	18 (7%)	9 (3.5%)	13 (5.1%)	11 (4.3%)	14 (5.4%)
Regiones generosamente permitidas	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Regiones no permitidas	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)