

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA PROTEÍNA MULTIEPITÓPICA COMO CANDIDATA PARA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE CARRIÓN

Carlos Patricio Padilla Rojas^{1,a}, Priscila Nayu Lope Pari^{1,a}, Lorena Santos Solis^{1,a}, Cleidy Osorio Mogollón^{1,a}, Lisbet Inga Angulo^{1,a}, Henri Bailon Calderon^{1,b}, Adolfo Marcelo Ñique^{1,a}, Jackeline Morales^{2,c}, Gladis Esther Ventura Egusquiza^{1,a}

RESUMEN

Objetivos. Diseñar y evaluar una proteína multiepitope como candidato a vacuna contra la enfermedad de Carrion. **Materiales y métodos.** Mediante herramientas bioinformáticas se seleccionó epitopes de proteínas de membrana externa y se diseñó una proteína multiepitope. El gen de la proteína multiepitope fue subclonado en el plásmido de expresión pET28b y transformado en *E. coli* BL21 pLys. La proteína multiepitope fue expresada usando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido y purificada usando resina. Esta proteína purificada fue utilizada para inmunizar ratones BALB/c y se obtuvo anticuerpos policlonales. Se realizaron ensayos de invasión *in vitro* usando una cepa de *Bartonella bacilliformis* (*B. bacilliformis*) a eritrocitos humanos. **Resultados.** La proteína multiepitope M1 presenta epitopes conservados entre aislamientos de *B. bacilliformis*, no tóxicos, no homólogos a proteínas humanas y superficiales. Los ratones inmunizados presentaron niveles de anticuerpos IgG capaces de reducir *in vitro* la tasa de invasión de *B. bacilliformis* a eritrocitos humanos. **Conclusiones.** La proteína multiepitope M1 podría servir como candidato a vacuna contra la enfermedad de Carrion; sin embargo, se requiere de más estudios para caracterizar el uso de este antígeno como vacuna.

Palabras clave: Infecciones por *Bartonella*; *Bartonella bacilliformis*; Biología computacional; Epitopes; ADN recombinante; Inmunogenicidad vacunal (fuente: DeCS BIREME).

DESIGN AND EVALUATION OF A MULTIEPITOPIC PROTEIN AS A CANDIDATE FOR A CARRION DISEASE VACCINE

ABSTRACT

Objectives. To design and assess a multiepitopic protein as a candidate for a vaccine against Carrion disease. **Materials and Methods.** Using bioinformatics tools, epitopes of external membrane proteins were selected and a multiepitopic protein was designed. The multiepitopic protein gene was subcloned into the expression plasmid pET28b and transformed into *E. coli* BL21 pLys. The multiepitopic protein was expressed using isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside and purified using resin. This purified protein was used to immunize BALB/c mice obtaining polyclonal antibodies. In vitro invasion assays were conducted using a strain of *Bartonella bacilliformis* (*B. bacilliformis*) in human red blood cells. **Results.** The multiepitopic protein M1 presents preserved epitopes between isolates of *B. bacilliformis* with are non-toxic, and not homologous to human and surface proteins. Immunized mice presented IgG antibody levels capable of reducing in vitro the rate of invasion of *B. bacilliformis* into human red blood cells. **Conclusions.** Multiepitopic protein M1 may serve as a candidate for a Carrion disease vaccine; however, more studies are needed to characterize the use of this antigen as a vaccine.

Keywords: *Bartonella* infections; *Bartonella bacilliformis*; Computational biology; Epitopes; DNA, recombinant; Immunogenicity, vaccine (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Carrion (EC), causada por la infección de *Bartonella bacilliformis* (*B. bacilliformis*), es un grave problema de salud pública en Perú, los casos de esta

enfermedad presentan incrementos de tendencia cíclicas según reportes de la Dirección General de Epidemiología (DGE). Asimismo, se presentaron brotes en diferentes provincias de los departamentos de Ancash, Cajamarca, La Libertad, Amazonas, Cuzco y Madre de Dios⁽¹⁻⁵⁾.

¹ Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Laboratorio de Vacunas Virales, Centro Nacional de Producción de Biológicos, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

^a Biólogo, BSc; ^b biólogo, MSc; ^c médico veterinario, BSc

Recibido: 31/05/2019 Aprobado: 28/08/2019 En línea: 23/09/2019

Citar como: Padilla Rojas CP, Lope Pari PN, Santos Solis L, Osorio Mogollón C, Inga Angulo L, Bailon Calderon H, et al. Diseño y evaluación de una proteína multiepitópica como candidata para vacuna contra la enfermedad de Carrion. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2019;36(3):414-22. doi: <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4430>.

Esta enfermedad es bifásica, la primera fase está caracterizada por anemia hemolítica y fiebre pudiendo producir la muerte; y la segunda fase es más benigna y está caracterizada por erupciones cutáneas verrugosas sangrantes autolimitadas. El control de esta enfermedad se basa en el control vectorial, diagnóstico precoz y medicación oportuna ⁽²⁻⁵⁾; sin embargo, en la actualidad todavía se reportan casos.

Por lo descrito, resulta indispensable el desarrollo de una vacuna, la cual requiere años de evaluación sistemática de antígenos. Una alternativa para acortar y mejorar el proceso de selección de antígenos de manera eficiente es usar la información genómica disponible, junto con herramientas inmunoinformáticas ^(6,7). Por otro lado, existe poca información acerca de posibles vacunas para la enfermedad de Carrión ⁽⁸⁾.

Las proteínas de membrana externa (OMP de outer membrane protein, por sus siglas en inglés) de muchos patógenos son consideradas buenas candidatas a vacunas. La inmunización con estas proteínas podría ser eficiente para la producción de anticuerpos que bloquearían la infección en modelos experimentales. Las proteínas OMP16, OMP19 y OMP31 de *Brucella ovis* son antígenos inmunodominantes, anticuerpos contra estas proteínas confieren una importante protección contra la brucelosis en el modelo murino ^(9,10). Para *Chlamydia trachomatis* se ha reportado que la proteína MOMP purificada puede generar protección en modelo murino y protege contra infección vaginal ^(11,12).

También se ha demostrado que las OMP purificadas de *Neisseria lactamica* protegen contra la infección de *Neisseria* spp serogrupo B y C aisladas de cuadros de meningitis ⁽¹³⁾. Otros estudios en vacunas basadas en OMP para *Neisseria meningitidis* del grupo B han demostrado ser eficaces en inducir respuesta protectora basada en anticuerpos en adultos sanos en Cuba, Brasil, Chile y Europa, con una eficacia entre el 50% al 80% ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Se ha reportado que *B. bacilliformis* presenta al menos 14 proteínas de membrana externa, las cuales tienen un peso molecular entre 11 KDa a 75 KDa. De estas proteínas de membrana externa, las que presentan 31 KDa, 42 KDa y 45 KDa son las más antigénicas ⁽¹⁸⁾.

En el presente estudio se diseñó y evaluó una proteína multiepitope como candidato a vacuna contra la enfermedad de Carrión.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es cuantitativo analítico experimental.

SELECCIÓN DE EPÍTOPES Y DISEÑO DE LA PROTEÍNA MULTIEPÍTOPE

Todas las proteínas deducidas del genoma de *B. bacilliformis* (cepa KC583, número de acceso GenBank CP000524) fueron utilizadas para seleccionar proteínas de

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio. La ausencia de una vacuna para prevenir la enfermedad de Carrión en zonas endémicas de Perú generó la necesidad de desarrollar una propuesta de vacuna contra este problema de salud pública. Al no existir un modelo animal para esta enfermedad abordamos un modelo de infección *in vitro*.

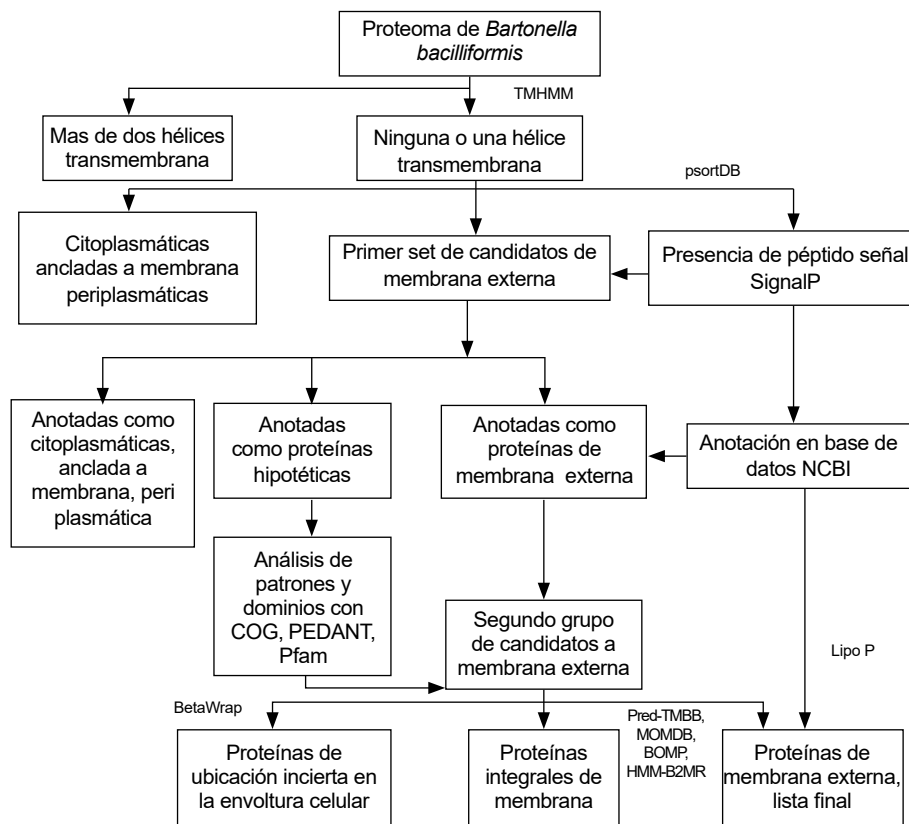
Principales hallazgos. La proteína multiepitope M1 es inmunogénica en el modelo murino. Además, los anticuerpos generados contra esta proteína inhiben la invasión de *Bartonella bacilliformis* a eritrocitos humanos en ensayos *in vitro*.

Implicancias. Este estudio contribuye al desarrollo de propuestas de vacunas experimentales contra la enfermedad de Carrión.

membrana externa, estas proteínas fueron consideradas como antígenos candidatos para la elaboración de una vacuna.

Las proteínas a analizar fueron seleccionadas según el algoritmo indicado en la Figura 1. Primero se seleccionó proteínas que tengan una o ninguna hélice transmembrana. Para investigar si contenían una región transmembrana alfa hélices se usó TMHMM 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Luego, de las proteínas seleccionadas se evaluó su posible localización como proteínas de membrana externa, para ello se usó la base de datos cPsortdb database (<http://db.psort.org>), se seleccionó si eran proteínas de membrana o eran proteínas cuya localización no se podía determinar. De aquellas proteínas que no se pudo predecir su localización celular se evaluó si presentaban péptido señal usando el programa SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), seleccionándose aquellas que presentaron péptido señal. A partir de este primer set de proteínas se seleccionó aquellas anotadas como proteínas de membrana externa o proteínas hipotéticas.

Del grupo de proteínas hipotéticas se seleccionó aquellas que presentaron dominios y patrones compatibles con otras proteínas de membrana externa, para ello se usó las bases de datos PEDANT database (<http://pedant.gsf.de>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>). Se realizó una predicción de lipoproteínas usando el programa LipoP 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>). Para evaluar la probabilidad que las proteínas formen beta hélices se usó el programa BetaWrap (<http://groups.csail.mit.edu/cb/betawrap/>). Para identificar posibles estructuras «beta-barrel» se usó los programas Betabarrel Outer Membrane protein Predictor (BOMP) (<http://www.bioinfo.no/tools/bomp>), el Prediction of TransMembrane Beta-Barrel Proteins server (PREDTMBB) (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/>), el Markov Chain Model for Beta Barrels prediction program (MCMBB) ([| 415](http://athina.biol.</p>
</div>
<div data-bbox=)



NCBI: National Center for Biotechnology Information

Figura 1. Algoritmo para selección de proteínas de membrana externa de *Bartonella bacilliformis*

uoa.gr/ bioinformatics/mcmbb/) y el B2TMR-HMM predictor (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/ predictors/>).

Una vez seleccionadas las proteínas de membrana externa, se evaluó si estas proteínas presentaban epítopes que se unieran al complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) I y II utilizando parámetros por defecto en los programas netpanMHC (<http://www.cbs.dtu.dk/ services/NetMHCpan/>), y netpanMHCII (<http://www.cbs.dtu.dk/ services/NetMHCIIpan/>). Además, se utilizó BIMAS (HLA Peptide Binding Predictions), SYPEITH (Epitope prediction), LBtope (Linear B-Cell epitope Prediction server - Imtech), BepiPred (BepiPred 1.0 Server), BCPREDS (B-cell epitope prediction server) y EIBD (Linear B cell epitope prediction tool). Se hizo una tabla de epítopes según un ranking de asociación con el MHC I y II.

Para determinar la conservación de los epítopes se comparó la secuencia de los epítopes de todos los genomas reportados mediante BLASTp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). La toxicidad de los epítopes fue evaluada usando el servidor ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/ raghava/toxinpred/>). Además, se seleccionó epítopes que no sean homólogos a epítopes de proteínas humanas mediante BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Los epítopes fueron evaluados midiendo su índice de accesibilidad con el servidor Emmi Surface Accessibility Prediction (<http://tools.immuneepitope.org/bcell>). Por otro lado, las proteínas fueron modeladas usando el servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu>) y sus estructuras visualizadas con PyMol versión 2.3 (<https://pymol.org>). El modelo de estructura obtenido fue evaluado según el índice de Ramachandra (<https://swift.cmbi.umcn.nl/ servers/html/ramchk.html>).

Durante el diseño de la proteína multiepítope, se verificó que no generen epítopes nuevos que se pudieran unir a MHC usando netpanMHC y netpanMHCII. Para calcular la cobertura teórica se utilizó el programa Population Coverage del servidor Epitope Prediction and Analysis Tools (<http://tools.iedb.org/population/>). A la secuencia de aminoácidos de la proteína multiepítope se adicionó seis residuos de histidina en el extremo carboxilo terminal para permitir su purificación mediante resinas de afinidad cargadas en níquel. Luego, a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína multiepítope se realizó traducción inversa y optimización de codones para su adecuada expresión en *Escherichia coli*. Finalmente, el gen sintético obtenido fue sintetizado comercialmente (Integrated DNA Technologies Inc., USA).

CLONAMIENTO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA MULTIEPÍTOPE EN *Escherichia coli*

El gen de la proteína multiepitope sintetizado en el plásmido pUC (Integrated DNA Technologies Inc., USA) fue liberado mediante digestión enzimática con las enzimas *Xho* I y *Nco* I, el fragmento liberado fue purificado y ligado al plásmido de expresión pET28 (Invitrogen Inc, USA) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

Para unir el fragmento liberado y el plásmido se usó la enzima ligasa T4 (Promega Corp., USA), luego se transformó *E. coli* BL21 pLys (Invitrogen Inc, USA) competentes preparadas mediante el método de cloruro de calcio⁽¹⁹⁾. La proteína multiepitope fue expresada mediante inducción con 0,5 mM IPTG (siglas de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (Sigma-Aldrich subsidiaria Merck, USA), y luego esta proteína fue purificada mediante cromatografía usando la resina de afinidad cargada de níquel Ni-NTA agarosa (QIAGEN N.V., Germany) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (Anexo 1).

INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C CON PROTEÍNA MULTIEPÍTOPE

Para obtener anticuerpos policlonales se realizó ensayos de inmunización, empleando ratones hembras BALB/c de cinco a ocho semanas de edad. Se inoculó por vía subcutánea a 15 ratones, la primera dosis consistió en 5 µg de proteína multiepitope suplementada con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich subsidiaria Merck, USA) a una concentración final de 50%. Luego se realizó tres refuerzos con 5 µg de proteína multiepitope suplementada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich subsidiaria Merck, USA). Estos refuerzos fueron administrados los días 7, 14 y 21 después de la inoculación inicial.

Un segundo grupo de 15 ratones fue inmunizado con el mismo esquema, pero usando como adyuvante alúmina (Sigma-Aldrich subsidiaria Merck, USA). Para el grupo control se siguió el mismo esquema de inmunización con diez ratones, reemplazando la proteína multiepitope por PBS (siglas de Phosphate-Buffered Saline) estéril y usando el adyuvante de Freund completo para la primera dosis e incompleto para los refuerzos. A los 30 días después de la primera dosis se sacrificó los ratones y se colectó sangre total. Después de 30 minutos de coagulación, se separó los sueros mediante centrifugación a 1700 rpm por 15 minutos. Los sueros fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

ELISA

El ensayo de ELISA (siglas de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) se realizó según el procedimiento

reportado anteriormente con algunas modificaciones⁽²⁰⁾. Las placas de ELISA fueron impregnadas con 100 ng de antígeno M1 recombinante purificado.

ENSAYO DE INVASIÓN

Eritrocitos humanos fueron obtenidos de donantes voluntarios (los cuales no nacieron ni viajaron a zonas endémicas de enfermedad de Carrión), estos eritrocitos fueron lavados dos veces con medio RPMI 1640 (siglas de Roswell Park Memorial Institute, Sigma-Aldrich) y cuantificados en cámara de Neubauer. *B. bacilliformis* fue cultivada en medio bifásico, cosechada y resuspendida en medio RPMI. La bacteria fue cuantificada por espectrofotometría a 600 nm.

Aproximadamente 10⁶ bacterias (en un volumen de 50 µL) fueron mezcladas con 50 µL de un pool de sueros de ratones inmunizados o con 50 µL de medio RPMI como control e incubadas por 30 minutos a 30 °C. Después de esta incubación se añadió la mezcla a 100 µL de eritrocitos lavados (10⁵ eritrocitos), se centrifugó a 500 g por cinco minutos y los viales fueron incubados por tres horas a 30 °C. Luego de esta incubación, se separó las bacterias libres de los eritrocitos usando gradiente de densidades, para ello se añadió 400 µL de ficoll-hypaque (Sigma-Aldrich) a un vial de 1,5 mL estéril y sobre el ficoll-hypaque se añadió cuidadosamente la muestra de eritrocitos infectados o los controles, estas muestras fueron centrifugadas a 500 g por 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó los eritrocitos dos veces con RPMI. Se purificó ADN a partir de toda la muestra de eritrocitos infectados utilizando el kit de purificación de PureLink Genomic DNA (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones, se lisó las células incubando la mezcla de muestra/buffer de lisis/proteinasa K a 65 °C por una hora y se eluyó el ADN genómico en 200 µL de solución de elusión.

Para calcular el número de genomas equivalentes presentes en la muestra se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real cuantitativo, para ello se utilizó por cada reacción: 12,5 µL de Sybr Green Master Mix (Roche), 1 µL de 5 µM de primer forward (5'-ATGTAATGGRAATTTAGG-3'), 1 µL de 5 µM de primer reverse (5'-GGAGCYGTATYAAAGAARTA-3'), y 5 µL de ADN purificado de cada experimento. Se aplicó el siguiente programa de amplificación: 95 °C por 10 minutos seguido de 45 ciclos de 95 °C por 20 s, 42 °C por 20 s, 50 °C por 20 s y 72 °C por 30 s. Asimismo, se realizó una curva estándar con ADN genómico purificado de la cepa ATCC (siglas de American Type Culture Collection) KC583 *B. bacilliformis*. Los ensayos de invasión fueron realizados por duplicado y repetidos dos veces. Por otro lado, los primers utilizados fueron diseñados para el presente estudio, estos primers son sensibles y específicos para la detección de *B. bacilliformis* por PCR en tiempo real (datos no publicados).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos fueron realizados usando R Studio versión 1.2.1335. Para evaluar la significancia estadística de las medias de los títulos de anticuerpos y ensayos de invasión se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para muestras independientes aleatorias. Se consideró como estadísticamente significativos los valores de p menores a 0,05.

ASPECTOS ÉTICOS

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Institucional en Seres Humanos y por el Comité de Ética para Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Salud de Perú.

RESULTADOS

SELECCIÓN DE EPÍTOPES Y DISEÑO DE LA PROTEÍNA MULTIEPÍTOPE

Las proteínas reportadas del genoma completo de *B. bacilliformis* fueron 1285 proteínas anotadas, estas fueron descargadas de la base de datos internacional Genbank, esta anotación presenta el estado de provisional. De estas proteínas, 142 tenían un dominio transmembrana tipo hélice (11,1%) y 979 proteínas no presentaban ninguno (76,3%) al ser evaluadas con TMHMM server. De estas proteínas seleccionadas, 24 fueron proteínas de membrana externa (1,9%) y 365 proteínas de localización desconocida (28,4%) al ser evaluadas por pSORT. Luego, se evaluó la presencia de péptido señal en la lista de proteínas cuya localización no podía ser determinada utilizando el programa SignalP, seleccionándose 103 proteínas. Así, se conformó la primera lista de 127 antígenos candidatos.

Esta primera lista se analizó su anotación en el GENBANK y se consultó las bases de datos PEDANT database, Pfam y COG, así se depuró diez proteínas citoplasmáticas y siete proteínas de localización periplasmática. Se incluyó dos proteínas anotadas como proteínas de membrana externa a partir del grupo de proteínas de localización desconocida y que no presentaban un dominio tipo péptido señal predecible. Asimismo, esta lista de proteínas fue depurada con los programas BOMP, PREDTMBB, MCMBB y B2TMR-HMM. Así, se obtuvo una lista final conformada por 112 proteínas. Esta lista incluye tres proteínas autotransportadoras, 25 proteínas de membrana externa (cinco de ellas anotadas como lipoproteínas), diez proteínas asociadas a membrana y 74 proteínas hipotéticas de función desconocida.

Se utilizó la lista de 112 proteínas de membrana externa para seleccionar epítopes que sean reconocidos por el

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II correspondientes a los alelos peruanos. Para ello se usaron ocho programas para minimizar los falsos positivos (netpanMHC, netpanMHCII, BIMAS, SYPEITH, LBtope, BepiPred, BCPREDS y EIBD), cada uno de estos programas con sus propios parámetros para la predicción. Se obtuvo una lista de epítopes los cuales fueron priorizados. Asimismo, todos los epítopes presentaron un índice de accesibilidad mayor a 1,00 usando Emmi Surface Accessibility Prediction. Se verificó que todos los epítopes estaban en la superficie de la estructura de sus proteínas modeladas con RaptorX. Asimismo, los epítopes seleccionados no fueron tóxicos. Se verificó la similitud de los epítopes seleccionados con la secuencia del genoma humano, para evitar la homología de secuencia con la proteína humana evitando que se formen autoanticuerpos utilizando Standard Protein BLAST.

Se verificó la conservación de los epítopes comparando las proteínas seleccionadas con cepas de la base del GenBank Hosp800-02, Car600-02, VERO075, PERU38, VERO097, CUSCO5, Cond044, PERU-18, Str. Heidi Mejía y SanPedro600. La lista de epítopes son indicados en la Tabla 1. La combinación elegida de epítopes no formó nuevos epítopes que se unan a MHC, la secuencia aminoacídica de la proteína multiepítope M1 se presenta en la Figura 2.

La proteína multiepítope M1 no forma estructuras secundarias complejas según su modelo teórico obtenido con RaptorX (Figura 3). El modelo de la estructura de la proteína multiepítope presenta un índice de Ramachandra de 98,4% (90,3% de residuos en posición favorable y 8,1% en regiones permitidas). Asimismo, la cobertura teórica de una vacuna basada en la proteína multiepítope M1 calculada por el programa Population Coverage es del 99,9% para población peruana.

NIVELES DE ANTICUERPOS OBTENIDO EN RATONES

Los ratones inmunizados con la proteína M1 suplementada con coadyuvante de Freund presentaron niveles de anticuerpos IgG más elevados (promedio 2,107; desviación estándar 0,141) que aquellos inmunizados con la proteína M1 suplementada con alúmina (promedio 1,190; desviación estándar 0,507). Estos dos grupos presentaron niveles de anticuerpos IgG más elevados que el grupo control (promedio 0,506; desviación estándar 0,190) (Figura 4). Se evidenció diferencias estadísticas entre los promedios de los grupos inmunizados y el control ($p < 0,005$).

INHIBICIÓN DE LA INVASIÓN DE *B. bacilliformis* A ERITROCITOS HUMANOS

El control de invasión de eritrocitos incubados con *B. bacilliformis* presentó cantidades similares de bacteria

Tabla 1. Epítopes seleccionados para conformar la proteína multiepítotope M1, estos son reconocidos por alelos del complejo mayor de histocompatibilidad I y II presente en la población peruana

GenBank	Nombre	Conservación %	MHC II		MHC I	
			Posición	Epítotope	Posición	Epítotope
WP_005766369	ATP sintasa subunidad b1	80 -100 *	114	AIQEISSAVNLAIS	--	No interacción
WP_005766764.1	Proteína que contiene el dominio DUF1009	100	160	EKNSILLAAKAAKLL	165	LAAKAAKLL
WP_005766132.1	Peptidasa de la familia M23	93,3 - 100 *	119	NFEWIRMALAEERLH	124	RMALAEERL
WP_005766132.1	Peptidasa de la familia M23	86,6 - 100 *	211	NNEYFPILPFIDPLQ	--	No interacción
WP_011807308	Peptidasa de la familia M23	93,3 - 100 *	254	QSQFSSNLSMQKSLQ	--	No interacción
WP_005766132.1	Peptidasa de la familia M23	86,6 - 100 *	168	TQTKMTLRSRPLNTY	169	QTKMTLRSR
WP_005766203	Proteína homóloga a metil transferasa	100	222	RILRADTAAVAALAI	223	ILRADTAAV
WP_005766517	Proteína de la familia de receptores dependientes de TonB	100	415	SRGFGLAFENEIDFY	418	FGLAFENEI
WP_005767319	Proteína de la familia LemA	100	173	YNTALKTMPAMLWAK	176	ALKTMPAML
WP_005766357	Proteína de membrana externa hipotética	100	286	TPEKLIKAYLNAKKMK	285	TPEKLIKAY
WP_005766862	Proteína de membrana externa hipotética	100	204	DSANFARDGLIELLT	209	ARDGLIELL
WP_005767808	Proteína de membrana externa hipotética	93,3 - 100 *	88	LIHDAIFQNFWGSYS	89	IHDAIFQNF

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, No interacción: el epítotope no interacciona con MHC
 A: alanina, R: arginina, N: asparagina, D: ácido aspártico, C: cisteína, Q: glutamina, E: ácido glutámico, G: glicina, H: histidina, I: isoleucina, L: leucina, K: lisina, M: metionina, F: fenilalanina, P: prolina, S: serina, T: treonina, W: triptófano, Y: tirosina, V: valina
 * El epítotope presenta cambios aminoacídicos respecto a la cepa Ver097 (cepa muy divergente considerada como posible subespecie)

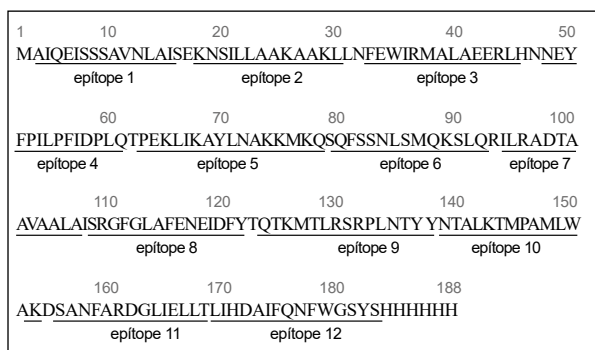
por ensayo (promedio $2,25 \times 10^5$; desviación estándar 0,126) que el grupo tratado con sueros de ratones control inmunizados con PBS/adyuvante de Freund (promedio 2,253; desviación estándar 0,206). Mientras que los ensayos de invasión tratados con los sueros del grupo de ratones inmunizados con M1/adyuvante de Freund (promedio 1,453; desviación estándar 0,170) y el grupo M1/adyuvante alúmina (promedio 1,093; desviación estándar 0,167) presentaron valores menores de bacteria por ensayo, indicando que los anticuerpos contra la proteína multiepítotope contenido en los sueros inhiben la invasión

de *B. bacilliformis* a los eritrocitos humanos en ensayos *in vitro* (Figura 5). Además, se observa una mayor inhibición cuando se utiliza como adyuvante a alúmina. Se evidenció diferencia estadística entre los promedios de los grupos tratados con los anticuerpos anti-M1 y el control ($p < 0,005$).

DISCUSIÓN

La proteína multiepítotope M1 es inmunogénica en el modelo murino. Además, los anticuerpos anti-M1 inhiben la invasión de *B. bacilliformis* a eritrocitos humanos en ensayos *in vitro*.

Nuestro estudio apunta al desarrollo de una vacuna contra la enfermedad de Carrión que permitiría reducir la



Alanina (A); arginina (R); asparagina (N); ácido aspártico (D); cisteína (C); glutamina (Q); ácido glutámico (E); glicina (G); histidina (H); isoleucina (I); leucina (L); lisina (K); metionina (M); fenilalanina (F); prolina (P); serina (S); treonina (T); triptófano (W); tirosina (Y); valina (V)

Figura 2. Secuencia aminoacídica de la proteína multiepítotope M1, conformada por epítopes seleccionados de la Tabla 1, la numeración indica la posición de los aminoácidos en la secuencia de la proteína. En el extremo carboxilo terminal presenta seis residuos de histidina para facilitar su purificación.

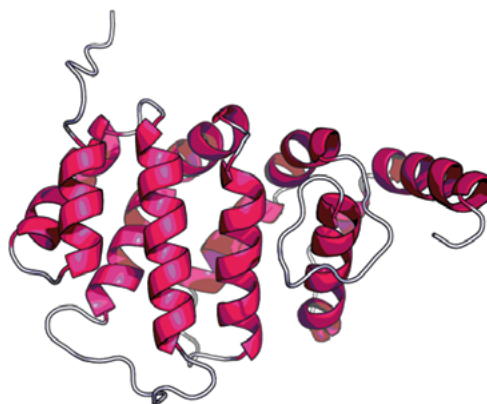


Figura 3. Modelo tridimensional de la proteína multiepítotope M1 obtenida con el servidor X-raptor, visualizado en el programa PyMol

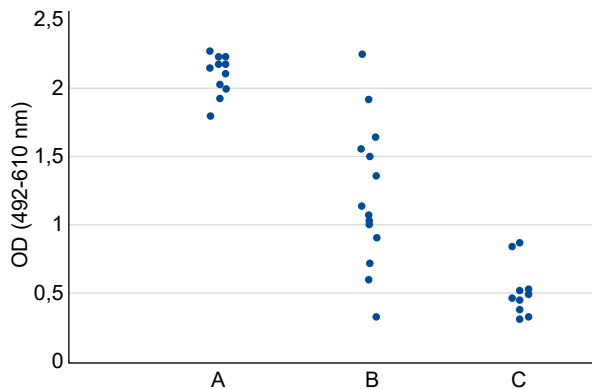
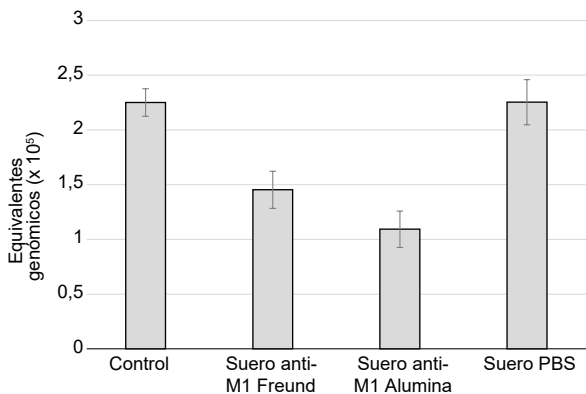


Figura 4. Niveles promedio de anticuerpos IgG anti-M1 en suero de ratones BALB/c inmunizados: A) inmunizados con proteína M1 y adyuvante de Freund, B) inmunizados con proteína M1 y adyuvante alúmina, y C) inmunizados con Phosphate-Buffered Saline (PBS) y adyuvante de Freund como control

mortalidad y morbilidad de esta enfermedad reforzando las medidas de control en Perú. Además, permitiría ahorrar los fondos empleados para el tratamiento de los casos, tanto a los programas de salud como a las familias de los casos. El uso del patógeno atenuado como vacuna para esta enfermedad tendría el riesgo de la reversión de la atenuación. Además, la preparación de antígenos totales o fracciones tampoco es viable en este caso pues es una bacteria de difícil crecimiento. El uso de antígenos recombinantes es una opción que ofrece la ventaja de que es posible obtener cantidades de antígenos adecuadas como para la producción de una vacuna. Asimismo, una proteína



PBS: Phosphate-Buffered Saline
M1: proteína multiépítópica M1

Figura 5. Inhibición de la invasión de *Bartonella bacilliformis* a eritrocitos humanos en ensayo *in vitro*. Control: eritrocitos infectados con *Bartonella bacilliformis*. Suero anti-M1 Freund: la bacteria fue incubada previamente con un *pool* de sueros policlonales anti-M1 de ratones inmunizados con la proteína M1 y adyuvante de Freund. Suero anti-M1 Alúmina: los sueros policlonales anti-M1 de ratones inmunizados con M1 y adyuvante Alúmina. Suero PBS: los sueros policlonales de ratones inmunizados con PBS más adyuvante de Freund. Las barras representan el promedio de equivalentes genómicos cuantificados luego del ensayo de invasión mientras que los bigotes representan un rango de dos veces la desviación estándar

multiépítope permitiría el uso de los mejores epítopes del proteoma del patógeno incrementando dramáticamente la calidad del candidato a vacuna. Esta misma aproximación ha sido utilizada para diseñar proteínas multiépítopes candidatas a vacuna contra otras infecciones bacterianas, virales y parasitarias ⁽²²⁻²⁶⁾.

Estos resultados refuerzan la importancia del uso de proteínas de membrana externa para el diseño de vacunas contra infecciones de bacterias gramnegativas como se ha reportado previamente ⁽⁹⁻¹¹⁾. Las proteínas de membrana externa constituyen buenos candidatos para el diseño de vacunas. Este algoritmo ha demostrado ser altamente sensible y ha sido utilizado con éxito para predecir proteínas candidatas para una vacuna recombinante contra la clamidiosis, en este estudio la mayor parte de candidatos (74/112) fueron proteínas hipotéticas ⁽²²⁾. Mientras que para *Brucella*, se seleccionó ocho proteínas hipotéticas de 32 ⁽²³⁾. Este hallazgo concuerda con el hecho que cerca del 27% de proteínas que conforman el proteoma de *B. bacilliformis* son proteínas hipotéticas ⁽²⁷⁾. Además, las OMP que se han detectado en *B. bacilliformis* se correlacionan con las reportadas anteriormente ⁽¹⁸⁾. Cabe señalar que estos resultados deberán ser confirmados mediante análisis proteómico de OMP de *B. bacilliformis*.

La proteína multiépítope M1 ha sido diseñado contra infecciones con *B. bacilliformis*; sin embargo, la inmunización con esta proteína podría generar algún grado de protección contra infecciones con otras especies de *Bartonella* de manera cruzada ya que los epítopes seleccionados presentan cierto grado de conservación con epítopes de otras especies. Asimismo, la metodología descrita en este artículo podría ser útil para diseñar vacunas contra infecciones de otras especies de *Bartonella* de importancia en salud pública como: *Bartonella ancashensis*, *Bartonella rochalimae*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, y *Bartonella clarridgeiae*.

Entre las limitaciones tenemos que no existe un modelo animal para la enfermedad de Carrion que sea útil para el desarrollo de una vacuna. Es por ello que hemos optado por utilizar un modelo de infección *in vitro*. Otro modelo plausible es la infección de monos *Aotus nancymae* con *B. bacilliformis* ⁽²¹⁾; sin embargo, este modelo no reproduce los síntomas clínicos como en la infección natural en el hombre. Por otro lado, la base de datos de HLA de población peruana actualmente disponible es muy limitada, es recomendable que esta base de datos sea ampliada para poder realizar predicciones más exactas.

Cabe resaltar que los anticuerpos obtenidos utilizando alúmina como coadyuvante muestra mejores resultados en el ensayo de invasión, esta observación puede ser atribuido a las distintas propiedades de estos adyuvantes. Alúmina incrementa la disponibilidad del antígeno y la

activación de células presentadoras de antígeno, mientras que es un pobre inductor de una respuesta inmune mediada por células. Por otro lado, el adyuvante completo de Freund reforzado con adyuvante incompleto estimula preferentemente una respuesta inmune Th2^(28,29).

Por otro lado, se espera que la proteína multiepitope M1 pueda despertar una respuesta inmune celular ya que se ha incluido epítopes para HLA tipo I en su diseño. Sin embargo, esto debe de ser evaluado experimentalmente. Los resultados indican que la proteína multiepitope M1 diseñada podría ser utilizada como vacuna contra la enfermedad de Carrión. Mas estudios son recomendables para caracterizar sus propiedades inmunogénicas y las condiciones más adecuadas para su posible utilización como vacuna.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los técnicos en laboratorio Juana Choque Portilla y David García Neyra por su colaboración en los aspectos técnicos. Además, agradecemos a los médicos veterinarios Gaby Colque Alave y Juan Levano Saravia por su apoyo y sugerencias en el manejo de ratones de

laboratorio. Asimismo, agradecemos al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) por el financiamiento otorgado para la ejecución de esta investigación de acuerdo al convenio 306-PNICP-PIAP-2015. También agradecemos al administrador Harrison Montejó Arévalo por su colaboración en los aspectos administrativos.

Contribuciones de los autores: CPPR, PNL, AMÑ, HBC, JM, GEVE han participado en la concepción y diseño del artículo; recolección de resultados; análisis e interpretación de datos; redacción del artículo; revisión crítica del artículo; aprobación de la versión final y aporte de material de estudio. LSS, COM, y LIA han participado en recolección de resultados, análisis e interpretación de datos, revisión crítica del artículo, y aprobación de la versión final.

Fuentes de financiamiento: Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) e Instituto Nacional de Salud

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Material suplementario: Disponible en la versión electrónica de la RPESP.

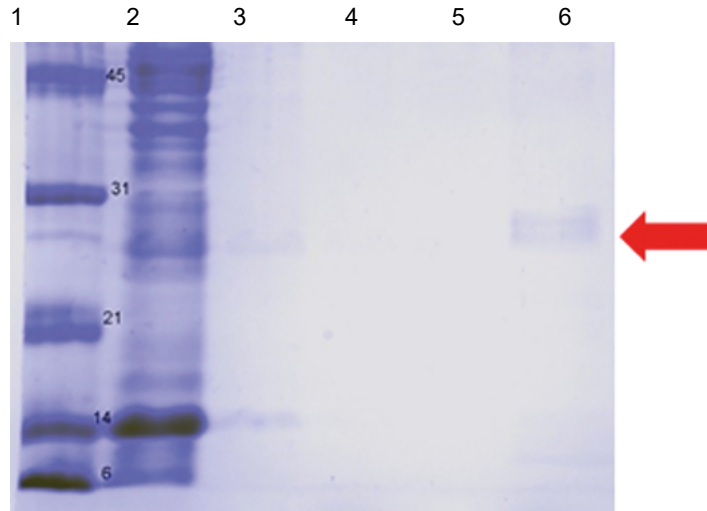
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Boletín Epidemiológico del Perú. Semana Epidemiológica (del 23 al 29 de diciembre de 2018) [Internet]. Lima: Dirección General de Epidemiología; 2018. [citado el 25 de julio del 2019]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2018/52.pdf>
2. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* sp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev. 1997;10(2):203-19. doi: 10.1128/CMR.10.2.203.
3. Maguiña C, Gotuzzo E. Bartonellosis. New and Old. Inf Dis N Amer. 2000;14(1):1-22. doi: 10.1016/S0891-5520(05)70215-4.
4. García-Quintanilla M, Dichter AA, Guerra H, Kempf VAJ. Carrion's disease: more than a neglected disease. Parasit Vectors. 2019;12(1):141. doi: 10.1186/s13071-019-3390-2.
5. Pons MJ, Gomes C, Del Valle-Mendoza J, Ruiz J. Carrion's Disease: More Than a Sand Fly-Vectored Illness. PLoS Pathog. 2016;12(10):e1005863. doi: 10.1371/journal.ppat.1005863.
6. Doytchinova IA, Taylor P, Flower DR. Proteomics in vaccinology and immunobiology: An informatics perspective of the immunone. J Biomed Biotechnol. 2003;(5):267-90. doi: 10.1155/S1110724303209232.
7. Korber B, LaBute M, Yusim K. Immunoinformatics Comes of Age. Plos Comp Biol. 2006;2(6):484-92. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020071.
8. Henriquez-Camacho C, Ventosilla P, Minnick MF, Ruiz J, Maguiña C. Proteins of *Bartonella bacilliformis*: Candidates for Vaccine Development. Int J Pept. 2015;2015:702784. doi: 10.1155/2015/702784.
9. Cloeckert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. Vet Microbiol. 2002; 90(1-4):229-47. doi:10.1016/S0378-1135(02)00211-0.
10. Bowden RA, Estein SM, Zygmunt MS, Dubray G, Cloeckert A. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. Microbes Infect. 2000; 2(5):481-8. doi: 10.1016/S1286-4579(00)00317-8.
11. Pal S, Theodor I, Peterson EM, de la Maza LM. Immunization with the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis major outer membrane protein can elicit a protective immune response against a genital challenge. Infect Immun. 2001;69(10):6240-7. doi: 10.1128/IAI.69.10.6240-6247.2001.
12. Stagg AJ. Vaccines against Chlamydia: approaches and progress. Mol Med Today. 1998;4:166-73. doi: 10.1016/S1357-4310(98)01232-5.
13. Oliver KJ, Reddin KM, Bracegirdle P, Hudson MJ, Borrow R, Feavers IM, et al. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. Infect Immun. 2002;70(7):3621-6. doi: 10.1128/iai.70.7.3621-3626.2002.
14. Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, Arnesen O, Fredriksen HH, Halstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. Lancet. 1991;338:1093-6. doi: 10.1016/0140-6736(91)91961-s.
15. De Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. Lancet. 1992;340:1074-8. doi: 10.1016/0140-6736(92)93086-3.
16. Sierra GVG, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PE, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. NIPH Ann. 1991;14:195-210.
17. Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger WD, Brandt B, Ruiz S, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Vaccine. 1995;13:821-9. doi: 10.1016/0264-410x(94)00037-n.
18. Minnick MF. Identification of outer membrane proteins of *Bartonella bacilliformis*. Infect Immun. 1994;62(6):2644-8.

19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
20. Gallegos K, Baldeviano C, Marcelo A, Padilla C. Clonamiento, expresión y seroreactividad del antígeno recombinante flagelina de *Bartonella bacilliformis*. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2005;22(1):39-46.
21. Bentzel DE, Espinosa BJ, Canal E, Blazes DL, Hall ER. Susceptibility of owl monkeys (*Aotus nancymaae*) to experimental infection with *Bartonella bacilliformis*. Comp Med. 2008;58(1):76-80.
22. Heinz E, Tischler P, Rattei T, Myers G, Wagner M, Horn M. Comprehensive *in silico* prediction and analysis of chlamydial outer membrane proteins reflects evolution and life style of the Chlamydiae. BMC Genomics. 2009;10:634. doi: 10.1186/1471-2164-10-634.
23. He Y, Xiang Z. Bioinformatics analysis of *Brucella* vaccines and vaccine targets using VIOLIN. Immun Res. 2010;6(Suppl 1):S5. doi: 10.1186/1745-7580-6-S1-S5.
24. Solanki V, Tiwari M, Tiwari V. Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep. 2019;9(1):5240. doi: 10.1038/s41598-019-41496-4.
25. Zhao X, Zhang F, Li Z, Wang H, An M, Li Y, Pang N, Ding J. Bioinformatics analysis of EgA31 and EgG1Y162 proteins for designing a multi-epitope vaccine against *Echinococcus granulosus*. Infect Genet Evol. 2019;73:98-108. doi: 10.1016/j.meegid.2019.04.017.
26. Nosrati M, Behbahani M, Mohabatkar H. Towards the first multi-epitope recombinant vaccine against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A computer-aided vaccine design approach. J Biomed Inform. 2019;93:103160. doi: 10.1016/j.jbi.2019.103160.
27. KEGG *Bartonella bacilliformis* [Internet]. Kyoto: Kanehisa Laboratories. [citado 25 de julio del 2019]. Disponible en: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism?org=bbk
28. Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells *in vitro*. Vaccine. 2005;23(13):1588-95.
29. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Trends Pharmacol Sci. 1993;14(5):174-8.

Correspondencia: Carlos P. Padilla Rojas.
 Dirección: Av. San Martín Mz: B, Lote: 30. Urbanización Mariscal Luzuriaga. San Juan de Lurigancho. Lima, Perú
 Teléfono: (+51) 4780000 Anexo 1424
 Correo electrónico: cpadillar@hotmail.com

MATERIAL SUPLEMENTARIO



Anexo 1. Expresión y purificación de la proteína recombinante multiepítotope M1, electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, la proteína purificada es señalada por la flecha. Carril 1: Marcador de peso molecular indicando el tamaño de cada banda en KDa. Carril 2: lisado total del clon recombinante M1 E. coli BL21. Carril 3: primer lavado de la purificación. Carril 4: segundo lavado de la purificación. Carril 5: primera elusión de la proteína M1 purificada. Carril 6: segunda elusión de la proteína M1 purificada