



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**



Identificación molecular de mecanismos de patogenicidad asociados al  
carga de microvesículas secretadas por bacterias Gram-negativas  
patógenas: evaluación *in silico* de la respuesta inmune contra porinas  
(OmpA y OmpC) de *Klebsiella pneumoniae*.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:  
C. NATALIA JOHANA MARTÍNEZ SULVARÁN

DIRECTOR:  
Dr. ALEJANDRO CARABARIN LIMA

CO-DIRECTOR:  
DRA. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

Julio de 2022.

## RESUMEN

En los últimos años, las enfermedades causadas por bacterias Gram negativas patógenas han adquirido gran relevancia en el sector salud, pues han ocasionado infecciones en una parte significativa de la población. Además se ha hecho evidente la resistencia de estas bacterias hacia un amplio espectro de antibióticos disponibles. En este contexto, la presente investigación tuvo como propósito utilizar los mecanismos de patogenicidad de la bacteria Gram negativa *Klebsiella pneumoniae*, específicamente la secreción de microvesículas de membrana externa y su cargo, para modelar y predecir *in silico* la respuesta inmunitaria humoral y celular contra diversas porinas encontradas en estas estructuras. Se realizó una recopilación de datos, ejecución de servidores inmuno-informáticos, evaluación y comparación de los resultados obtenidos en las diferentes plataformas y bases de datos, con la literatura disponible, para encontrar dos proteínas altamente prometedoras; OmpA y OmpC, que pueden ser candidatas para la elaboración de nuevas vacunas que protejan contra este patógeno oportunista.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer principalmente a mi tutor, el Dr Alejandro Carabarin Lima por su paciencia, conocimiento y dedicación, quien no me hizo dudar ni un momento en mi capacidad de realizar el presente trabajo. A mis padres Natalia Sulvarán Landeros y Raúl Martínez Mena por apoyarme en cada decisión de mi vida universitaria y brindarme su cariño incondicional, a Michelle Martínez Espinosa una gran amiga que ha estado siempre a mi lado en mis mejores y peores momentos, a David Moreno Gutiérrez por inspirarme y mostrarme todo lo bello de la ciencia y hacerme ver que los sueños se cumplen si estás dispuesto a trabajar en ellos, a Sara Isabel Carrillo Gonzáles y Saúl García Campos por reaparecer en mi vida en el momento perfecto para devolverme la motivación y la confianza en que soy capaz de lograr cosas grandes, y a mi querido amigo Andrés David Baleon Tlapanco por tantos años de amistad llenos de grandes consejos.

# ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	5
2.	ANTECEDENTES	6
2.1	Bacterias Gram negativas	6
2.2	Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia	7
2.3	Vesículas de Membrana Externa; <i>Outer Membrane Vesicles</i> (OMVs)	8
2.4	OMV asociadas a patogenicidad	10
2.5	Biogénesis de las OMV	11
2.6	Respuesta inmune	12
2.7	Bacterias Gram negativas de importancia clínica	15
2.8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
3	JUSTIFICACIÓN	17
4	HIPÓTESIS	17
5	OBJETIVOS	17
5.1	Objetivo general	17
5.2	Objetivos específicos	18
6	MATERIALES Y MÉTODOS	18
7	RESULTADOS	22
7.1	Homología entre OMVs de bacterias Gram negativas	22
7.2	Secuencias protéicas	24
7.3	Propiedades fisicoquímicas	25
7.4	Interacción proteína-receptor TLR 1;2. ClusPro	27
7.5	Refinamiento en Chimera y visualización en PyMol	27
7.6	Análisis de los complejos PRODIGY y PDBsum	30
7.7	Evaluación de la respuesta humoral	33
7.8	Evaluación de la respuesta celular	36
8	DISCUSIÓN	41
9	CONCLUSIONES	52
10	PERSPECTIVAS	53
11	REFERENCIAS	54
12	ANEXOS	66

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que viven en todo tipo de entornos, son de tamaño microscópico, por lo general entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud; y diversas formas incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos) que se multiplican por división celular. Dentro de los nichos ecológicos habituales de estos microorganismos, podemos encontrar el propio cuerpo humano, en el cual habitan y tienen diferentes interacciones biológicas que pueden ser de tipo simbiótico hasta parasitario. Algunas de estas interacciones confieren propiedades benéficas al organismo, estableciendo relaciones mutualistas, propiciando la salud del hospedero. Otras se favorecen estableciendo comensalismo; donde no benefician, pero tampoco perjudican al hospedero. El conjunto de estas interacciones bacterianas establecen la microbiota del hospedero, y están ampliamente relacionadas con muchos de los procesos naturales del organismo que las alberga (Leidner, 2018).

Por otro lado, existen otras bacterias que son de gran interés clínico, debido a que son la causa de muchas enfermedades infecciosas, las cuales pueden llegar a ser letales. Estas bacterias son denominadas “patógenas”, y tienen varios mecanismos que les permiten causar daño al hospedero con la finalidad de asegurar su supervivencia en el mismo. Existen dos tipos de patógenos: los primarios, que regularmente causan enfermedades a una elevada porción de individuos en condiciones normales, y los patógenos oportunistas, que causan enfermedad solo en los individuos que se encuentran inmuno-suprimidos. Es importante mencionar que existe una delgada línea entre esta clasificación, pues se ha demostrado que un patógeno oportunista en un hospedero, puede comportarse como un patógeno primario en otro, y esto además es dependiente de las condiciones ambientales en las que se encuentran (Martínez, 2014).

Dentro de las diversas clasificaciones bacterianas, existe una de gran relevancia que las divide en dos categorías: las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas; cuya diferencia está relacionada con la conformación de su membrana celular. La clave es el contenido de peptidoglucano (mureina), uno de los principales constituyentes de la pared

celular bacteriana, formando una capa gruesa en las bacterias Gram positivas y una capa delgada en las bacterias Gram negativas (Panawala, 2017).

Una manera de distinguir a las bacterias Gram negativas y positivas en el laboratorio es mediante la tinción de Gram, que lleva el nombre de su creador Hans Christian Gram. En esta metodología, se realiza una tinción diferencial, donde a partir de una serie de tratamientos, es posible visualizar al microscopio a las bacterias Gram negativas con una coloración rosácea, y a las Gram positivas de un color violeta (Mora, 2012).

### Bacterias Gram negativas

Como se ha mencionado anteriormente, la clasificación entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas está ampliamente relacionada con su envoltura celular (**figura 1**). La envoltura de las Gram negativas consta de dos membranas, la membrana externa y la membrana citoplasmática, y el espacio periplásmico intermedio, que contiene una capa de peptidoglicano (PG). La membrana externa es una barrera celular que se compone al interior de fosfolípidos y al exterior de lipopolisacárido (LPS; endotoxina) (Schwechheimer, 2015).

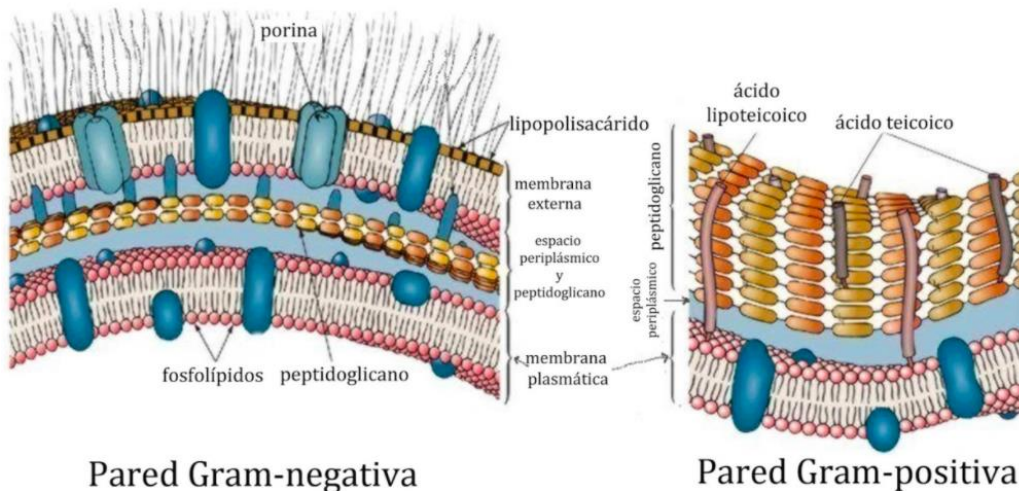


Figura 1. Pared celular de bacterias Gram negativas y positivas

Esta membrana actúa como una barrera contra varios compuestos (como los antibióticos), y está involucrada en el proceso de conjugación y de división celular, contiene sistemas de

captación de nutrientes; como el hierro, vitaminas y carbohidratos; también provee un ambiente protector contra ciertas enzimas hidrolíticas, y une a las proteínas que residen en la región periplásmica (DiRienzo, 1978). La membrana citoplasmática consta de una bicapa de fosfolípidos que actúa como barrera electroquímica (Schwechheimer, 2015), es un sistema activo de transporte, fosforilación oxidativa y la biosíntesis de ciertas macromoléculas (DiRienzo, 1978). El periplasma es un entorno oxidativo que promueve el plegamiento de proteínas (Schwechheimer, 2015).

### **Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia**

Los microorganismos están sometidos de una manera constante a una gran variedad de estímulos ambientales (cambios de temperatura, osmolaridad, pH, disponibilidad de nutrientes). En respuesta a estos factores de estrés, las bacterias han evolucionado para desarrollar sistemas que les permitan su adaptación; y además para que puedan establecer relaciones más estrechas con su hospedero, con la finalidad de propiciar su supervivencia, ayudando a su vez a la progresión de la enfermedad (Neil et al, 2001).

Todo el proceso y las propiedades de una bacteria requeridas para colonizar al huésped, incluyendo la obtención de requerimientos nutricionales, la evasión de la defensa del hospedero, la capacidad de multiplicarse y producir daño; en otras palabras, la habilidad de un microorganismo para causar enfermedad, junto con las características que tiene para que se lleve a cabo la infección, es lo que se denomina mecanismo de patogenicidad. A su vez, estos procesos infecciosos pueden llevarse a cabo gracias a los factores de virulencia que poseen ciertos patógenos, los cuales van a determinar el grado de patogenicidad de un microorganismo. Los factores de virulencia pueden tener un número indefinido de funciones, incluyendo la capacidad para facilitar la adherencia microbiana y la invasión, así como la promoción del crecimiento de un microorganismo en el hospedero, evadiendo su detección y la respuesta inmune. Algunos factores de virulencia son: adhesinas, invasinas, impedinas, agresinas, modulinas, toxinas; entre otros (Martora, 2019).

Además, ciertos factores de virulencia tienen la capacidad de generar resistencia a antimicrobianos. En la actualidad las bacterias Gram negativas representan un desafío debido a la resistencia a antibióticos, pues su envoltura membranal externa, se ha adaptado para brindarle mecanismos de protección, asegurando su supervivencia en el hospedero (Shin et al, 2019).

### **Microvesículas (OMV's)**

Si bien se han reconocido a las bacterias como organismos unicelulares, en la naturaleza no se encuentran como células únicas, más bien se encuentran relacionadas con otras células, ya sea de su propia especie o en relación con otros organismos. Por lo tanto, es necesario que se puedan comunicar entre ellas y con su hospedero, para propiciar las condiciones adecuadas de su nicho ecológico. Existen diversos mecanismos de comunicación célula-célula, mediados por la secreción de ciertas moléculas. Un ejemplo muy claro es la secreción de ciertas proteínas bacterianas que juegan un papel fundamental en la comunicación y la patogénesis de las bacterias. Esta secreción está relacionada con la eliminación de moléculas que generan estrés, en el censado de la presencia de nutrientes y en la eliminación de competidores. Hasta la fecha se conocen seis sistemas de secreción en las bacterias Gram negativas (I – VI) (Pugsley, 2021).

Además de los mecanismos de secreción, se reconoció a otro mecanismo de comunicación en las bacterias Gram negativas, mediado por la secreción de nano-vesículas y denominado como sistema de secreción cero (Guerrero-Mandujano A, et al. 2017). Se ha demostrado que en respuesta a estrés las bacterias son capaces de generar y secretar estas vesículas. Para el caso de las bacterias Gram negativas, estas vesículas son llamadas OMVs por sus siglas en inglés “Outer membrane vesicles” (Jagannadham et al., 2015).

Las vesículas de la membrana externa son partículas esféricas, formadas por una bicapa, de aproximadamente 20-400 nanómetros de diámetro, que contienen componentes derivados de la bacteria, constituidas principalmente de fosfolípidos (PLs), proteínas de la membrana externa, lipopolisacáridos (LPs), proteínas periplásmicas y componentes de la pared celular.

(Roier, 2016). Dentro de sus constituyentes también se incluyen ácidos nucleicos (ADN, ARN), iones, metabolitos, moléculas de señalización y enzimas (**figura 2**) (Zavan et al., 2020; Roier et al., 2016).

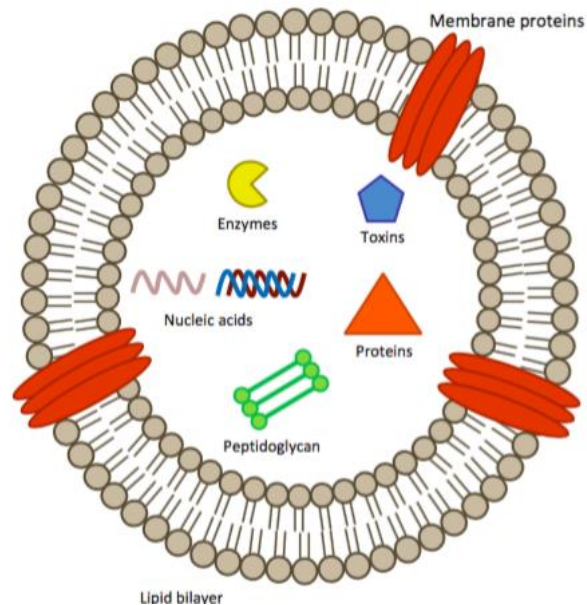


Figura 2. Estructura de las microvesículas de membrana externa de las bacterias gram negativas (Zavan et al. 2020)

Estas estructuras son secretadas naturalmente y no como resultado de la fragmentación celular o la lisis de la membrana externa. Las primeras OMVs en ser observadas provinieron de *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Esto fue posible gracias a los estudios con microscopía electrónica, los cuales ayudaron a revelar su forma y una densidad electrónica predominante en el centro de la partícula esférica (**Figura 3**) (Jagannadham et al., 2015).

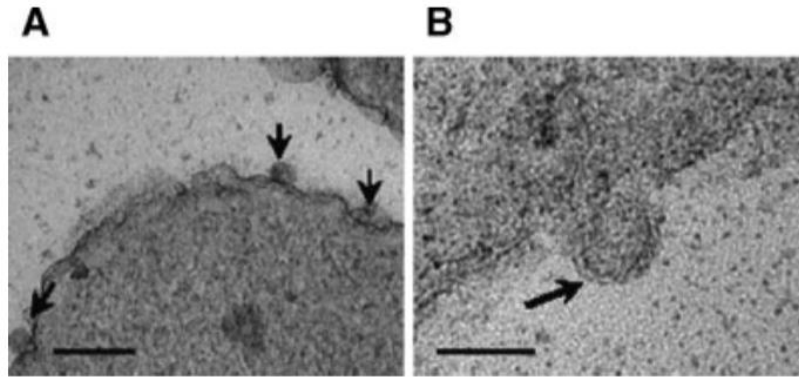


Figura 3. Microscopía electrónica de OMVs en *E. coli* (Lutsa, 2011)

### OMVs patogenicidad

Las OMVs tienen importantes papeles biológicos en la comunicación intercelular; además de ser esenciales en la patogenicidad y virulencia de las bacterias: esto gracias a que son comúnmente secretadas, además contienen proteínas bacterianas y otros factores de virulencia que favorecen los mecanismos de patogenicidad. Se han realizado estudios en muestras (fluidos como sangre y orina) de pacientes infectados, así como en animales de laboratorio, revelando que las bacterias producen OMVs en el tejido infectado del hospedero (Jagannadham et al., 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, las microvesículas secretadas son de gran importancia en la comunicación intra e intercelular. En la actualidad se conoce su participación en la transferencia de material genético y la formación de biofilms, así como en la progresión de la enfermedad y la inflamación (Roier et al., 2016). Dentro de sus múltiples papeles biológicos, tienen una participación muy importante en la nutrición y la protección de las células (Jagannadham et al., 2015). Promueven además la adherencia a la célula del hospedero y funcionan como inmunomoduladores (Roier et al., 2016).

Se ha demostrado además, que la producción de estas vesículas es mayor en especies patógenas que en las no patógenas, lo que conlleva al entendimiento de sus funciones en la patogénesis de la enfermedad. Las OMVs pueden también desencadenar patogénesis severas, mejorar la supervivencia bacteriana, participar en la transferencia horizontal de genes (Tran

et al., 2017), transportar compuestos tóxicos y desencadenar la respuesta inmune en el hospedero (Shin et al., 2019). Además, otros estudios han revelado que la producción de éstas microvesículas es mayor cuando la bacteria se encuentra en estrés (McBroom, 2006). Por último, también se sabe que las OMVs son un transporte activo de toxinas y otras biomoléculas, eliminando competidores, y tienen un papel fundamental en la resistencia a antibióticos (Portas et al., 2015).

Las OMVs pueden empacar moléculas bacterianas externas, como las quinolonas en *Pseudomonas aeruginosa*, molécula que contribuye a la comunicación celular, coordinando la formación de los biofilms (Mashburn and Whiteley 2005).

El DNA contenido en algunas OMVs puede ser transferido a las células vecinas, incluyendo el DNA que codifica para la resistencia a antibióticos, resaltando el potencial papel de las microvesículas en la transferencia horizontal de genes. Además también pueden contener ARN, incluyendo ARN mensajero, ribosomal y ARN pequeños (Blenkiron et al. 2016).

### **Biogénesis de OMVs**

Existen diversos mecanismos de biogénesis descritos en la literatura, dentro de los cuales destaca el llamado “brotos o ampollas”; mecanismo que se ha observado en numerosas especies Gram negativas. Estos brotes ocurren cuando una porción de la membrana externa protruye hacia la superficie celular, para luego ser liberadas y crear la vesícula. Otros componentes de la membrana externa, como los fosfolípidos y LPS, han demostrado estar implicados en la biogénesis de las vesículas (**Figura. 4**) (Zavan et al., 2020).

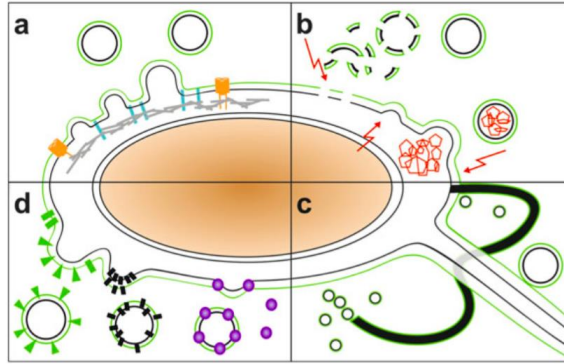


Figura 4. Modelos de biogénesis. (a) Formación de OMV por la pérdida de enlaces entre la membrana externa (LPS en verde y fosfolípidos en negro) y el peptidoglicano (mostrado en gris) ya sea por porinas (naranja) o proteínas (azul). (b) Formación de OMV por respuesta a estresores (flechas rojas): sustancias que atacan a la membrana, altas temperaturas, daño al ADN, bacteriófagos, acumulación de osmolitos. (c) Formación de OMV asociado a estructuras filamentosas y tubulares de la superficie bacteriana, como son los nanotubos. (d) Formación de OMV por la modulación de componentes de la membrana externa, como es el LPS (rectángulos verdes a triángulos), intercalación de moléculas inductoras de curvaturas (círculos morados) y la modulación en la composición de fosfolípidos (negro) (Zavan et al. 2020).

Existen además ciertas circunstancias que conllevan a la producción de las OMVs. El estrés celular determinado por las condiciones de crecimiento (Park et al. 2015), el estadio de crecimiento, cambios en la temperatura o la presencia de antibióticos, pueden alterar la biogénesis de las microvesículas. Los factores de estrés, reguladores bacterianos, moléculas de la respuesta inmune del hospedero, contribuyen al incremento en la producción de las OMVs. El incremento en la biogénesis de estas partículas, contribuyen a la patogénesis de la bacteria (Zavan et al. 2019).

## Respuesta inmune

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra bacterias invasoras y residentes en el humano, está compuesto por un amplio rango de mecanismos de defensa, que incluyen los receptores del sistema inmune innato, células y la producción de moléculas antimicrobianas e inflamatorias. Se destaca por su gran capacidad de detectar rápidamente e iniciar una respuesta inmune contra las microvesículas bacterianas. El sistema inmune adaptativo es aquel que desarrolla respuestas patógeno-específicas, creando inmunidad a largo plazo (Zavan, 2020).

Para poder sobrevivir en el hospedero humano, los microorganismos deben de evadir la respuesta inmune de defensa. Todos los organismos multicelulares han desarrollado un mecanismo de defensa innato, que tiene la capacidad de ser activado cuando se reconocen microorganismos extraños, y que tiene como principal función, destruir a los patógenos y neutralizar sus factores de virulencia (Medzhitov and Janeway 1997).

Uno de los principales mecanismos que le permiten a la bacteria interactuar con su célula hospedera, es la secreción de productos inmuno-estimulatorios. Las microvesículas bacterianas son liberadas y actúan como transportadores de secreción para proteínas, lípidos y otros productos bacterianos. Debido a los constituyentes de las vesículas, estas son inmuno-estimuladoras en las células eucariotas del hospedero, pues contienen un número de patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) como son el LPS, el ADN, el peptidoglicano, y otros componentes de la pared celular, que son capaces de inducir una respuesta proinflamatoria (Kaparakis, 2015).

Estos patrones son reconocidos por ciertos receptores que se encuentran en el hospedero, los más importantes son los receptores Tol-like (TLRs) que se encuentran localizados en la membrana de las células hospederas (Ellis and Kuehn 2010). Existen también otros receptores intracelulares de tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (NLR), receptores similares al gen I (RIG-I) inducibles por ácido retinoico (RLR) y lectinas de tipo C, que pueden ser solubles o funcionan como receptores asociados a la membrana (**Figura 5**) (Kawai y Akira 2008). Las lectinas de tipo C contribuyen a las respuestas inmunitarias innatas a muchos patógenos (Wells et al. 2011).

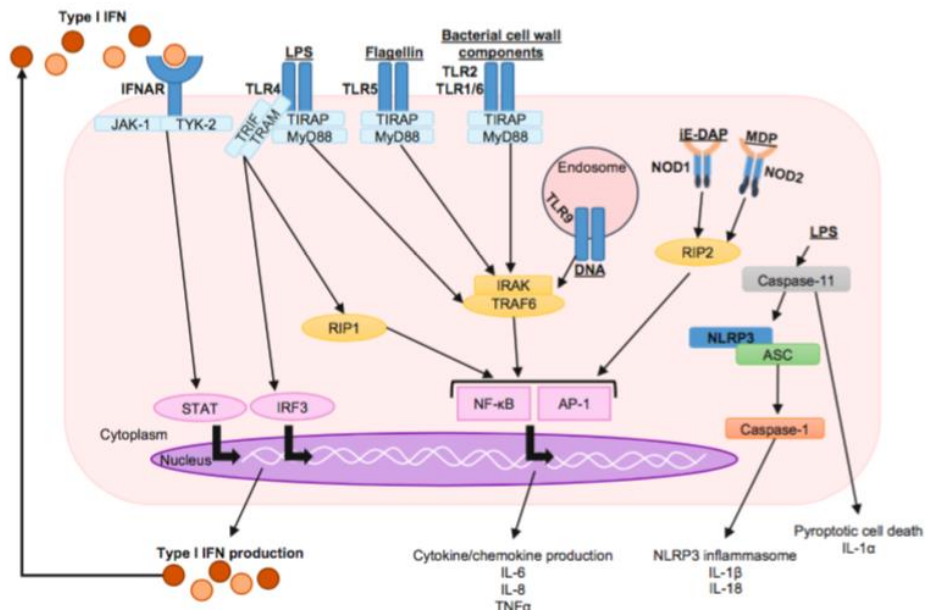


Figura 5. Receptores de PAMPs (Zavan et al. 2020)

El lipopolisacárido (LPS), es un constituyente predominante en las OMVs de las bacterias Gram negativas, el cual induce una respuesta del sistema inmune innato muy fuerte en el hospedero (Jagannadham et al., 2015). La detección de las OMVs activa una cascada de señalización, resultando en la iniciación de la respuesta inmune innata, y la producción de citocinas proinflamatorias, así como el reclutamiento de células del sistema inmune (Bielig et al. 2011).

Se ha demostrado que las OMVs tienen la capacidad de proteger a la bacteria en contra del sistema inmune innato del hospedero, ya sea degradando componentes del complemento, o interfiriendo con receptores que reconocen a las bacterias, reduciendo la eficiencia del sistema inmune y permitiendo a la bacteria invadir correctamente (Duncan et al. 2004).

El sistema inmune también emplea péptidos antimicrobianos, como las defensinas, como otro mecanismo en contra de la invasión de los patógenos. Estos péptidos pueden atacar directamente a los microorganismos, limitando su patogenicidad, sin embargo se ha demostrado que las OMVs contribuyen a la resistencia de estos péptidos, como es el caso de *V. Cholerae*. Esto gracias al secuestro de las moléculas del sistema inmune del hospedero

(Zavan, 2020). La inmunogenicidad de las OMV, puede ser alterada por ciertas bacterias, como *V. cholerae*, en respuesta a cambios en la expresión de factores de virulencia, mediados por quórum sensing (Bielig et al. 2011).

### **Bacterias Gram negativas de importancia clínica**

Existe un grupo de bacterias Gram negativas multirresistentes frecuentemente encontradas en hospitales e integrado por: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter sp*, las cuales son causantes de la mayoría de las infecciones nosocomiales, y desafortunadamente cada vez más resistentes a antimicrobianos (Rice., 2008).

Los bacilos Gram negativos no fermentadores representan  $\geq 15\%$  de las muestras aisladas obtenidas de laboratorios de microbiología clínica. Las bacterias no fermentadoras son a menudo multirresistentes a antibióticos como los carbapenémicos y oxiamino-cefalosporinas (Memish et al., 2012).

#### ***Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* es uno de los principales organismos responsables de infecciones intrahospitalarias, que causan niveles significativos de morbilidad y mortalidad. Es un patógeno oportunista que puede generar infecciones invasoras como bacteremias o septicemias (Andrade, 2004). Las infecciones causadas por este microorganismo son severas y tienen una tasa de letalidad de aproximadamente 35%, por lo que se le considera una amenaza clínica y de salud pública (Valdez, 2018).

El género fue llamado así en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de finales del siglo XIX. Hoy en día también existe una fuerte teoría que la relaciona con la Espondilitis Anquilosante (CODEINEP, 2012). *K. pneumoniae* es una bacteria Gram negativa, encapsulada e inmóvil que se encuentra en el medio ambiente y se ha asociado con neumonía

en poblaciones de pacientes hospitalarios, que típicamente coloniza las superficies mucosas humanas de la orofaringe y el tracto gastrointestinal. Una vez que la bacteria ingresa al cuerpo, puede mostrar altos grados de virulencia y resistencia a los antibióticos (Ashurst and Dawson, 2021).

En el año 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos prioritarios para la fabricación de nuevos antibióticos en tres categorías. Destaca entre los de máxima prioridad o crítica la *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC). La producción de carbapenemasas es un mecanismo de resistencia con gran relevancia clínica y epidemiológica (Valdez, 2018). En la actualidad se han detectado nano-vesículas de membrana externa (OMVs) en *Klebsiella pneumoniae*, implicadas en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos (Portas, 2015).

Los fármacos más efectivos contra los patógenos bacterianos son los antibióticos, pero la *K. pneumoniae* produce  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y es resistente a muchos antibióticos clínicos, como los aminoglucósidos, el sulfametoxazol, las fluoroquinolonas y la trimetoprima, lo que representa un gran desafío para la prevención y control de la infección por *K. pneumoniae*. Además, *K. pneumoniae* también puede propagar genes de resistencia a los medicamentos a otras cepas a través de la transmisión mediada por plásmidos (Hu et al., 2022).

## **JUSTIFICACIÓN**

Las microvesículas secretadas son elementos importantes en la patogenicidad de las bacterias Gram negativas. Se ha demostrado que su contenido puede variar entre especies, y también es dependiente de las condiciones ambientales en las que se encuentre, así como de su estadio de crecimiento o de infección. *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria Gram negativa de gran importancia clínica debido a la incidencia de infecciones en los hospitales causadas por estos patógenos oportunistas. En la actualidad es necesario mejorar las estrategias para el control y prevención de este tipo de infecciones.

El metaanálisis sobre las proteínas encontradas en microvesículas permitirá realizar una comparación con la finalidad de identificar aquellas que estén altamente conservadas y que puedan servir como una alternativa en la detección de estos patógenos en muestras de sangre, para el desarrollo de nuevas vacunas, así como para el mayor entendimiento de los mecanismos de patogenicidad asociados a las microvesículas. Con la ayuda del metaanálisis será posible encontrar proteínas de interés que puedan funcionar como futuras vacunas para éste patógeno.

## **HIPÓTESIS**

En el contenido de las microvesículas de membrana externa de bacterias Gram negativas, existen factores de virulencia que les confieren características necesarias para sobrevivir y propiciar un nicho ecológico adecuado dentro del hospedero, dichos factores también pueden ser candidatos para el diseño de nuevas vacunas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Realizar un metaanálisis e identificar proteínas localizadas en las microvesículas de membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* para su evaluación *in silico* como potenciales vacunas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar un metaanálisis del contenido asociado a microvesículas de bacterias Gram negativas e identificar proteínas asociadas a mecanismos de patogenicidad.
- 2) Elegir proteínas de gran relevancia para ser evaluadas mediante inmunobioinformática
- 3) Realizar un docking molecular para evaluar la respuesta inmune innata de las proteínas seleccionadas contra el receptor TLR 1/2.
- 4) Analizar las interacciones para elegir el mejor complejo molecular
- 5) Evaluar *in silico* la respuesta humoral y celular del sistema inmune de las proteínas seleccionadas

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Búsqueda bibliográfica

En como plataformas como ScienceDirect, Science, Scopus, Springer, PubMed, Google Académico, se realizaron las siguientes búsquedas, con la finalidad de obtener información de las proteínas encontradas en las OMV de bacterias Gram negativas y elegir aquellas más prometedoras, para esta búsqueda se utilizaron las siguientes palabras de entrada.

OMV AND Gram-negative bacteria.

OMV AND *Klebsiella pneumoniae*.

OMV AND *Acinetobacter baumannii*.

OMV AND *Escherichia Coli*.

OMV AND *Salmonella typhimurium*.

OMV AND *Neisseria meningitidis*.

OMP AND Immunoinformatics

OMP AND / OR Immune Simulation Analyses

### **Metaanálisis del cargo en las OMVs en bacterias Gram-negativas.**

Se realizó un análisis bibliográfico con el objetivo de encontrar proteínas encontradas en las OMV de diferentes bacterias Gram negativas: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*. Se seleccionaron aquellas proteínas relacionadas con los mecanismos de patogenicidad de dichas bacterias, dando prioridad a las porinas. Una vez realizada la selección, se obtuvieron las secuencias protéicas en formato FASTA desde la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente se utilizó BLASTp protein-protein (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Threshold 0.5, Matriz BLOSUM62; para comparar la homología entre las proteínas reportadas de bacterias Gram negativas y *Klebsiella pneumoniae*.

### **Secuencias de las porinas seleccionadas**

La secuencia de aminoácidos de las proteínas OmpA y OmpC (también conocida como OmpK3) fueron descargadas en formato FASTA de NCBI. Para la porina Omp A se utilizó el número de acceso RefSeq: WP\_223413757.1; la secuencia de nucleótidos se encuentra con el número de acceso en GenBank: NZ\_JAGYDX010000028.1. Para la porina Omp C se ocupó el número de acceso RefSeq: WP\_228299009.1; su secuencia de nucleótidos en GenBank: NZ\_JAGTIY010000009.1.

### **Propiedades fisicoquímicas de las proteínas**

Se utilizó el servidor ProtParam de Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>), añadiendo la secuencia de aminoácidos previamente descargada en formato de una sola letra (Gasteiger, 2005).

### **Docking molecular**

Se realizó un docking molecular utilizando las siguientes entradas PDB: 2K0L para OmpA (dominio transmembranal; <https://www.rcsb.org/structure/2K0L>), 5O79 para OmpC (OmpK36; <https://www.rcsb.org/structure/5O79>) y 2Z7X para el receptor TLR 1/2 (<https://www.rcsb.org/structure/2Z7X>). Para el docking molecular se utilizó el servidor ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/home.php>) tomando en cuenta los aminoácidos disponibles para la interacción (Kozakov, 2017). El refinamiento de las cadenas de los

modelos elegidos se realizó en Chimera. La visualización de las interacciones en la interfaz se observaron en PyMOL. La afinidad de unión se predijo en PRODIGY (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy/>), especificando la temperatura a 37°C. Por último, se analizaron las interacciones entre los complejos formados en PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>), especificando las cadenas responsables de la unión proteína-receptor.

### **Predicción de epítomos de células B**

La identificación de los epítomos se realizó en BepiPred - 2.0 de IEBD: Immune Epitope Database and Analysis Resource (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>) y ABCpred 2.0 ([https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)); una red neuronal artificial para la predicción de epítomos, tomando en cuenta epítomos de 16mer para cada proteína y un Threshold de 0.51.

### **Predicción de epítomos para células T**

Se realizó la elección de alelos con respecto a la base de datos Allele Frequencies 2020 (AFND; <http://www.allelefrequencys.net/hla6006a.asp>), delimitado a México, en números de poblaciones mayores a 100. Una vez elegidos los alelos, se procedió a buscar los epítomos para MHC de clase I y MHC de clase II con el servidor IEBD (<https://www.iedb.org/>), servidor que usa metodologías como NetMHCIIpan y Consensus (Wang, 2010).

Los alelos seleccionados para cada búsqueda fueron los siguientes:

MHC clase I: HLA-A\*01:01, HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:06, HLA-A\*03:01, HLA-A\*24:02, HLA-A\*31:01, HLA-A\*68:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*08:01, HLA-B\*14:02, HLA-B\*15:01, HLA-B\*18:01, HLA-B\*27:02, HLA-B\*35:01, HLA-B\*39:01, HLA-B\*40:01, HLA-B\*40:02, HLA-B\*44:02, HLA-B\*48:01, HLA-B\*51:01, HLA-C\*03:02, HLA-C\*04:01, HLA-C\*07:01, HLA-C\*08:01

MHC clase II: DRB1\*01:01, DRB1\*03:01, DRB1\*04:03, DRB1\*04:07, DRB1\*04:10,  
DRB1\*07:01, DRB1\*08:02, DRB1\*10:01, DRB1\*11:01, DRB1\*11:04, DRB1\*12:01,  
DRB1\*13:01, DRB1\*14:02, DRB1\*14:06, DRB1\*15:01, DRB1\*16:01, DRB1\*16:02

DPA1\*01:03-DPB1\*02:01, DPA1\*01:03-DPB1\*04:01, DPA1\*02:01-DPB1\*01:01,  
DPA1\*02:01-DPB1\*05:01, DPA1\*02:01-DPB1\*14:01, DPA1\*03:01-DPB1\*04:02,  
DQA1\*01:01-DQB1\*05:01, DQA1\*01:02-DQB1\*06:02, DQA1\*03:01-DQB1\*03:02,  
DQA1\*04:01-DQB1\*04:02, DQA1\*05:01-DQB1\*02:01, DQA1\*05:01-DQB1\*03:01

## RESULTADOS

### Homología entre OMVs de bacterias Gram negativas.

Después de realizar una investigación bibliográfica, se seleccionaron aquellas proteínas relacionadas con los mecanismos de patogenicidad de las bacterias Gram negativas, principalmente porinas, cuyas secuencias se encontraban anotadas en la base de datos NCBI, de las bacterias: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Neisseria meningitidis*, para evaluar la homología entre las proteínas de dichas bacterias y *Klebsiella pneumoniae*, utilizando la herramienta BLASTp, los resultados se muestran en las **Tablas 1-4**. Las proteínas seleccionadas fueron las siguientes:

*Acinetobacter baumannii*: OmpA (Tiku, 2021), OmpK (Guo, 2018).

*Escherichia Coli*: OmpF OmpC LamB (Thoma, 2018).

*Salmonella typhimurium*: OmpA, OmpC, Omp D, MipA, LamB, TolC, SipA (Liu, 2016).

*Neisseria meningitidis*: Oligopeptidase A, Omp85, MafA (Vaugan, 2006).

**Tabla 1. BLAST proteínas de *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*.**

<i>Acinetobacter baumannii</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Query Cover	E value	Identidad
OmpA	Integral membrane protein YfiB	98%	0	93.98%
	OmpA family protein	31%	1E <sup>-19</sup>	45.05%
OmpK	Nucleoside-specific channel-forming protein	100%	0	100%
	Ion channel protein Txs	44%	4E <sup>-69</sup>	95.33%

**Tabla 2. BLAST proteínas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae***

<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Query Cover	E value	Identidad
OmpC	OmpC	100%	0	89.47%

	OmpK36 porin	100%	0	79.94%
OmpF	OmpF precursor	100%	0	99.72%
	Phosphorin PhoE	100%	0	77.07%
	OmpC	100%	0	75.97%
	OmpE precursor	99%	$6E^{-150}$	60.16%
	OmpK37	99%	$3E^{-141}$	58.91%
	OmpK36	99%	$5E^{-140}$	59.20%
LamB	Maltoporin	100%	0	96.19%
	IS5 family transposase	80%	0	97.49%
	LamB maltoporin	100%	0	73.21%

**Tabla 3. BLAST proteínas de *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae***

<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Query Cover	E value	Identidad
OmpA	OmpA	100%	0	94.57%
OmpC	OmpC	100%	0	86.24%
	OmpK36	100%	0	85.19%
Omp D	Phosphoporin PhoE	91%	0	83.98%
	Porin OmpC	91%	0	79.35%
	Porin OmpK27	91%	$1E^{-160}$	63.19%
MipA	MltA-int protein MipA	100%	$2E^{-158}$	84.27%
	MipA/OmpV family protein	100%	$3E^{-153}$	81.85%
LamB	Maltoporin	100%	0	84.4%
	LamB	100%	0	73.79%
SipA	SipA	15%	$3E^{-50}$	94.39%

**Tabla 4. BLAST proteínas de *Neisseria meningitidis* y *Klebsiella pneumoniae***

<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Query Cover	E value	Identidad
-------------------------------	------------------------------	-------------	---------	-----------

Oligopeptidase A	Oligopeptidase A	99%	0	50.8%
	M3 family peptidase	45%	0	96.15%
Omp85	BamA/TamA famuly OMP	36%	0	99.65%
MafA	adhesin	49%	1E <sup>-110</sup>	98.08%

### Secuencias protéicas

Con base en los resultados arrojados del meta análisis y junto con el respaldo de investigaciones publicadas anteriormente (Martora, 2019), se comprobó la presencia de dos porinas de gran relevancia en el cargo de las OMVs de *Klebsiella pneumoniae*; OmpA y OmpC (OmpK36). Dichas proteínas constan de 356 y 369 aminoácidos respectivamente y, para su posterior análisis *in silico*, se obtuvieron las secuencias en formato FASTA de ambas proteínas:

#### Omp A

```
>WP_223413757.1 porin OmpA [Klebsiella pneumoniae]
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAVPKDNTWYAGGKLGWSQYHDTGFYGNFQNNNGPTRNDQLGAGAFGGYQ
VNPYLGFEFGYDNLGRMAYKGSVDNGAFKAQGVQLTAKLGYPIITDDLDIYTRLGGMVWRADSKGNYASTG
VSRSEHDTGVSPVFAGGVEWAVTRDIATRLEYQWVNNIGDAGTVGTRPDNGMLSLGVSYRFGQEDAAPVV
APAPAPAPEVATKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQALDQLYTQLSNMDPKDGSVAVVLGYTDRIQSEAYN
QQLSEKRAQSVVDYLVAKGIPAGKISARGMGESNPVTGNTCDNVKARAALIDCLAPDRRVEIEVKGYKEV
VTQPAA
```

#### OmpC (OmpK36)

```
>WP_228299009.1 porin OmpC [Klebsiella pneumoniae]
MLIRTFLLKVLVSLVLPALLVAGAANAEEIYNKDGKLDLYGKIDGLHYFSDDKSVGDQTYMRVGVKGETQ
INDQLTGYGQWEYINVQANNTESSSDQAWTRLAFAAGLKFAGDAGSFDYGRNYGVVYDVTSWTDVLPFEGGDT
YGSDFLQSRANGVATYRNSDFFGLVDGLNFALQYQKNGSVSGEGATNNGRGWSKQNGDGFGTSLTYDI
WDGISAGFAYSHSKRTDEQNSVPALGRGDNAETYTGGLKYDANNIYLASQYTQTYNATRAGSLGFANKAQ
NFEVVAQYQDFDFGLRPSVAYLQSKGKDLERGYGDQDILKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDDNSFT
RNAGISTDDVVALGLVYQF
```

## Propiedades fisicoquímicas

Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de las proteínas en el servidor ProtParam con la finalidad de entender más acerca de las características de las porinas seleccionadas con base en su secuencia de aminoácidos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

### OmpA

Número de aminoácidos: 356

Peso molecular: 38072.64 Da

pI teórico: 6.00

Fórmula:  $C_{1687}H_{2610}N_{468}O_{521}S_9$

Índice de inestabilidad: 24.24 (proteína estable)

Índice alifático: 73.48

Gran promedio de hidropatía (GRAVY): -0.326

### Omp C

Número de aminoácidos: 369

Peso molecular: 40549.37 Da

pI teórico: 4.62

Fórmula:  $C_{1808}H_{2699}N_{481}O_{580}S_3$

Índice de inestabilidad: 20.29 (proteína estable)

Índice alifático: 70.33

Gran promedio de hidropatía (GRAVY): -0.465

El valor (GRAVY) es usado para representar el valor de hidrofobicidad de un péptido. Los números negativos indican que las moléculas son hidrofílicas, por lo tanto, esta es una característica que comparten las dos estructuras. El servidor Proparam también es ideal para conocer la conformación de aminoácidos en nuestras secuencias de estudio. A continuación, se demuestran unas tablas con la composición aminoacídica de cada porina (**Tabla 5 y 6**).

**Tabla 5.** Composición de OmpA

Composición de Aminoácidos OmpA				
1	Ala	A	42	11.80%
2	Arg	R	15	4.20%
3	Asn	N	19	5.30%
4	Asp	D	23	6.50%
5	Cys	C	2	0.60%
6	Gln	Q	17	4.80%
7	Glu	E	13	3.70%
8	Gly	G	42	11.80%
9	His	H	3	0.80%
10	Ile	I	11	3.10%
11	Leu	L	23	6.50%
12	Lys	K	19	5.30%
13	Met	M	7	2.00%
14	Phe	F	11	3.10%
15	Pro	P	17	4.80%
16	Ser	S	17	4.80%
17	Thr	T	22	6.20%
18	Trp	W	6	1.70%
19	Tyr	Y	17	4.80%
20	Val	V	30	8.40%

**Tabla 6.** Composición de OmpC

Composición de Aminoácidos OmpC				
1	Ala	A	30	8.10%
2	Arg	R	13	3.50%
3	Asn	N	28	7.60%
4	Asp	D	33	8.90%
5	Cys	C	0	0.00%
6	Gln	Q	19	5.10%
7	Glu	E	10	2.70%
8	Gly	G	44	11.90%
9	His	H	2	0.50%
10	Ile	I	10	2.70%
11	Leu	L	31	8.40%
12	Lys	K	17	4.60%
13	Met	M	3	0.80%
14	Phe	F	19	5.10%
15	Pro	P	4	1.10%
16	Ser	S	26	7.00%
17	Thr	T	23	6.20%
18	Trp	W	5	1.40%
19	Tyr	Y	28	7.60%
20	Val	V	24	6.50%

### Interacción proteína-receptor TLR 1/2

Para poder analizar las interacciones entre las proteínas OmpA y OmpC con TLR 1/2, es necesario encontrar las estructuras proteicas reportadas en la base de datos PDB. Se obtuvieron tres entradas; 2K0L (OmpA dominio transmembranal), 5O79 (OmpC) y 2Z7X (TLR 1/2), receptor que está altamente involucrado en el reconocimiento de porinas (**Figura 6**).

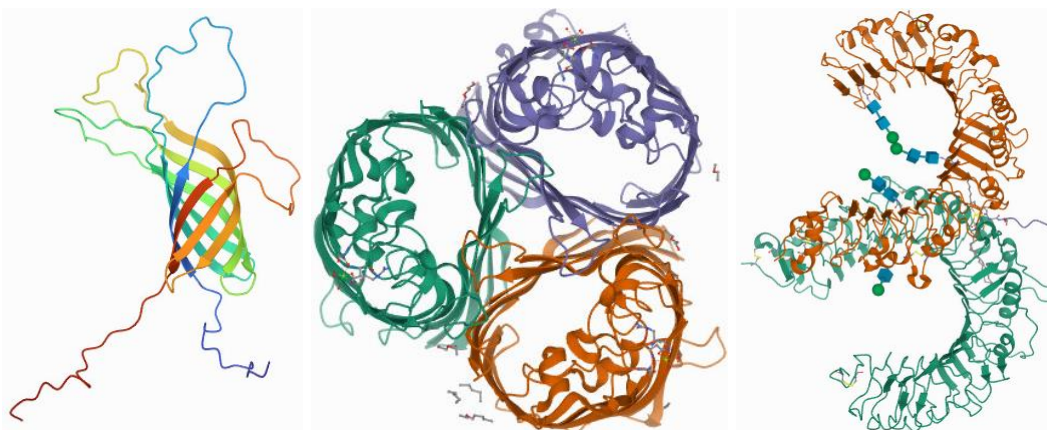


Figura 6. a) OmpA: 2K0L. b) OmpC: 5O79 y c) TLR 1/2: 2Z7X, respectivamente. Estructuras PDB.

Se llevó a cabo la interacción de los receptores y ligando en el servidor ClusPro, y se obtuvieron 30 modelos por entrada; cada modelo se estudió y se eligió el mejor para cada proteína de acuerdo con la energía necesaria para la formación del complejo. Los modelos elegidos arrojaron los siguientes resultados energéticos: -1286.5 en ClusPro 2.0 y -21 (kcal mol<sup>-1</sup>) en PRODIGY con una Kd(M) a 37°C de 4.10E<sup>-16</sup> para el Modelo 1 del complejo OmpA/TLR1;2. -1447.2 en ClusPro 2.0 y -22.2 (kcal mol<sup>-1</sup>) en PRODIGY con una Kd(M) a 37°C de 2.20E<sup>-16</sup> para el Modelo 14 del complejo OmpC/TLR1;2.

### Refinamiento en Chimera y visualización en PyMol

Una vez elegidos los modelos, se realizó un refinamiento de las cadenas de cada proteína en Chimera, con la finalidad de evaluar las interacciones con más detalle. Posteriormente se utilizó el Software PyMol para visualizar la superficie de contacto entre las proteínas, así como los aminoácidos involucrados y la distancia de interacción entre sus átomos (**Figuras 7, 8, 9, 10, 11 y 12**).



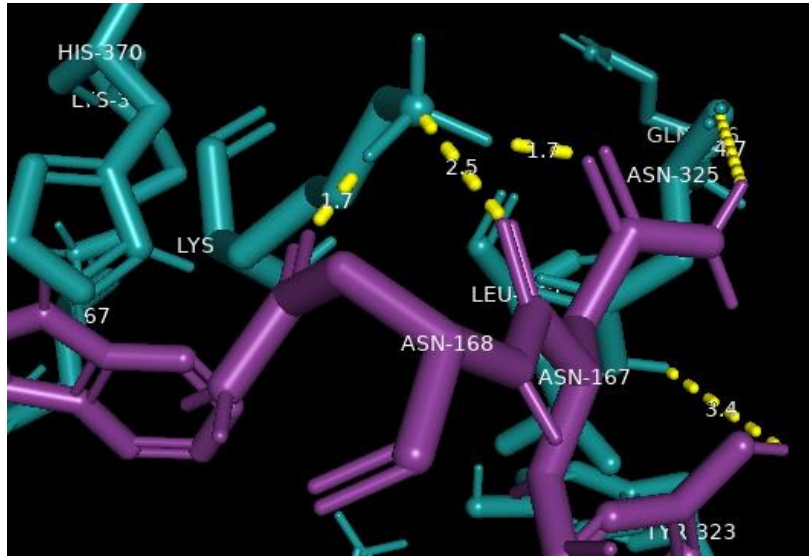


Figura 9. Interacciones entre los aminoácidos involucrados en la formación del complejo TLR1/2:OmpA en PyMol. Se visualiza la distancia entre los átomos en Ångstroms.

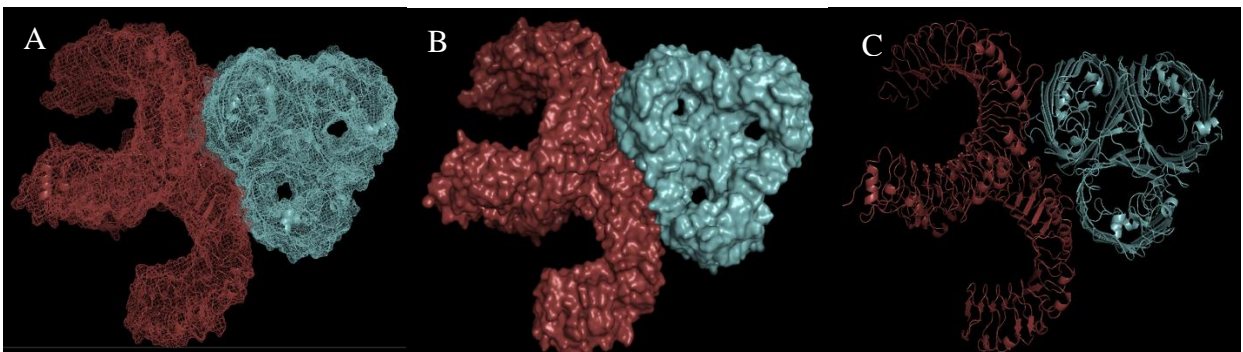


Figura 10. Complejo TLR1/2 y OmpC en PyMol. A, B y C muestran diferentes superficies.

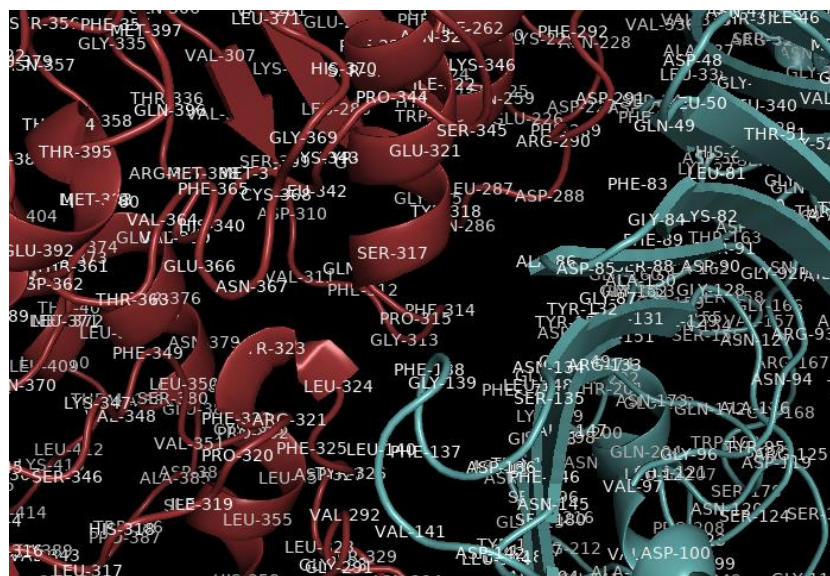


Figura 11. Acercamiento en la superficie de contacto del complejo TLR1/2:OmpC para una mejor visualización de la interfaz en PyMol. Se etiquetaron los residuos en código de una sola letra, seguido de su posición.

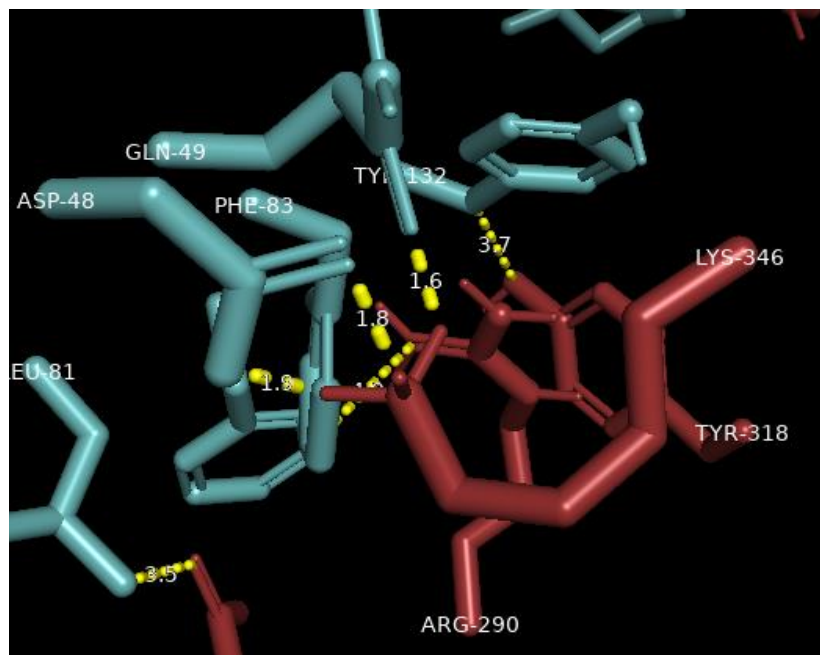


Figura 12. Interacciones entre los aminoácidos involucrados en la formación del complejo TLR1/2:OmpC en PyMol. Se visualiza la distancia entre los átomos en Ångstroms

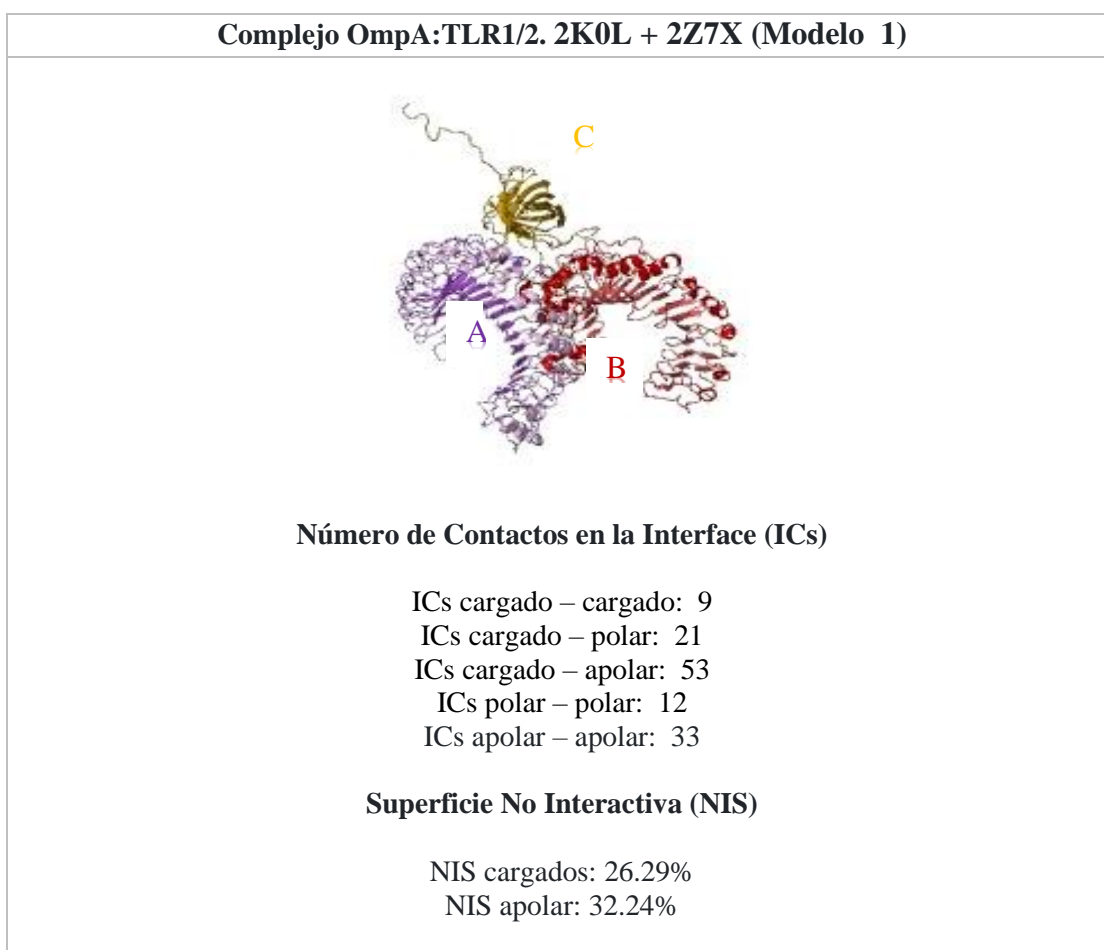
### Análisis de los complejos

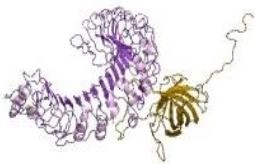

Una vez formados los complejos y refinadas las cadenas, es posible analizar a detalle cada modelo para así seleccionar el adecuado para este estudio. Para ellos se usó el servidor de PRODIGY (Tabla 7).

**Tabla 7.** Energías de unión entre los complejos (ClusPro y PRODIGY)

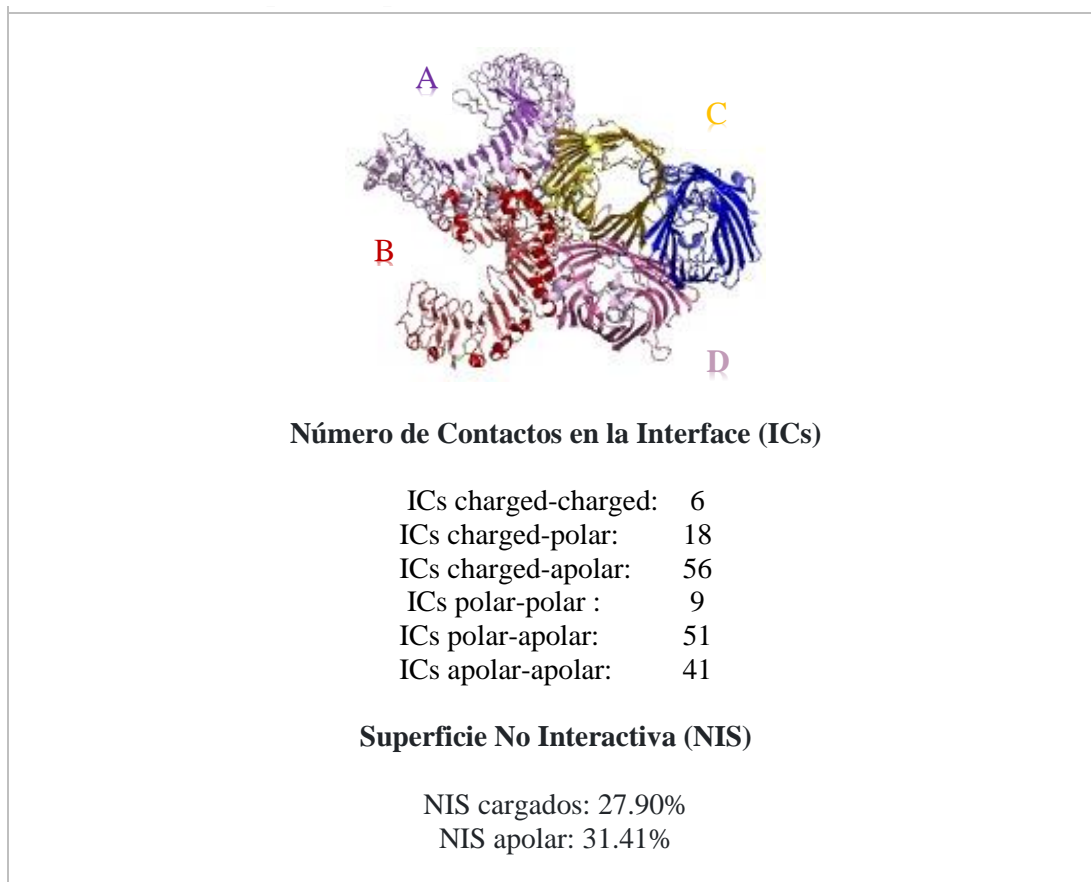
	Modelos	ClusPro 2.0 Menor energía	PRODIGY $\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	Kd(M) a 37°C
OmpA y TLR 1/2 (2K0L + 2Z7X)	<b>1</b>	<b>-1286.5</b>	<b>-21.8</b>	<b>4.10E<sup>-16</sup></b>
	6	-1401.4	-19.3	2.60E <sup>-14</sup>
	8	-1285.4	-20.4	4.40E <sup>-15</sup>
OmpC y TLR 1/2 (5O79 + 2Z7X)	3	-1456.6	-19.1	3.40E <sup>-14</sup>
	7	-1399.6	-19.4	2.00E <sup>-14</sup>
	<b>14</b>	<b>-1447.2</b>	<b>-22.2</b>	<b>2.20E<sup>-16</sup></b>

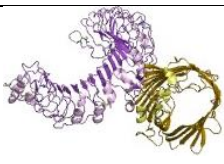

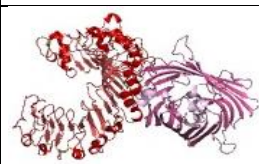
En los resultados, podemos destacar los modelos que favorece más las interacciones para análisis posteriores. El modelo 1 de la porina OmpA y el modelo 14 de la porina OmpC, tienen una mejor afinidad de unión. Por lo anterior, esos modelos se evaluaron en PDBsum para visualizar las interacciones entre los aminoácidos involucrados en el complejo. En la **Tabla 8** se pueden observar las diversas interacciones que tienen las cadenas A y B (pertenecientes a TLR 1/2) con el dominio transmembranal de OmpA (2K0L). Asimismo, en la **Tabla 9** se observan las interacciones entre TLR 1/2 con las cadenas de la porina OmpC (5O79).



PDMsum	Chain A + Chain C		Chain B + Chain C	
Complejos				
Residuos interaccionando	25	26	17	17
Área de la interface (A <sup>2</sup> )	1392	1347	809	834
Puentes salinos	-		2	
Puentes disulfuro	-		-	
Puentes de H	11		11	
Non-bonded contacts	179		106	

**Tabla 8.** Tipos de interacciones entre los aminoácidos involucrados en la formación del complejo OmpA:TLR1/2.



PDMsum	Chain A + C		Chain B + C		Chain B + D	
Complejos						
Residuos interaccionando	17	20	10	12	16	19
Área de la interface (Å <sup>2</sup> )	1005	932	658	562	938	827
Puentes salinos	-		1		-	
Puentes disulfuro	-		-		-	
Puentes de H	7		5		10	
Non-bonded contacts	132		82		108	

**Tabla 9.** Tipos de interacciones entre los aminoácidos involucrados en la formación del complejo OmpC:TLR1/2.

### Evaluación de la respuesta humoral

Identificación de epítomos para las células B. Se identificaron varios epítomos dentro de las secuencias proteicas. Se tomaron en cuenta aquellos epítomos que coincidieron en más de un servidor (Bebipred 2.0, IEDB y ABCpred).

Para el caso de OmpA, se identificaron los siguientes epítomos: ASTGVSRSSEHDTGVSP, TRDIATRLEYQWVNNI, GDAGTVGTRPDNGMLS, PVTGNTCDNVKARAAL, PVVAPAPAPAPEVATK, NGMLSLGVSYRFGQED y GQEDAAPVVAPAPAPA, los cuales coincidieron en más de dos servidores. Por otra parte, también se identificaron otros epítomos que coincidían parcialmente en dos servidores: HDTGFYGNFQNNNGP, RGMGESNPVTGNTCDN, GSEAYNQQLSEKRAQS, LGRMAYKGSVDNGAFK y GFQNNNGPTRNDQLGA. A continuación se muestra la posición de los epítomos en la secuencia proteica de la porina OmpA en las **Figura 13 y 14**.

**OmpA:**

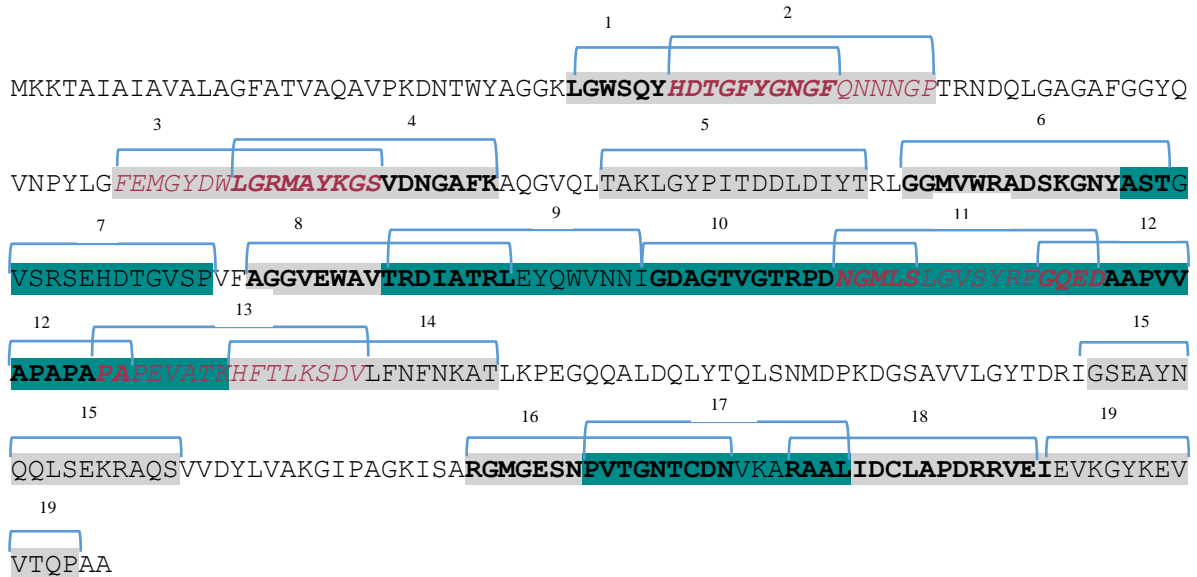


Figura 13. Epítomos dentro de la secuencia proteica de OmpA. Se utilizó el subrayado azul para el caso de los epítomos con la mejor coincidencia, y en gris aquellos con una sincronía parcial. Por otro lado, se utilizaron negritas y cursiva rosa para poder identificar epítomos traslapados.

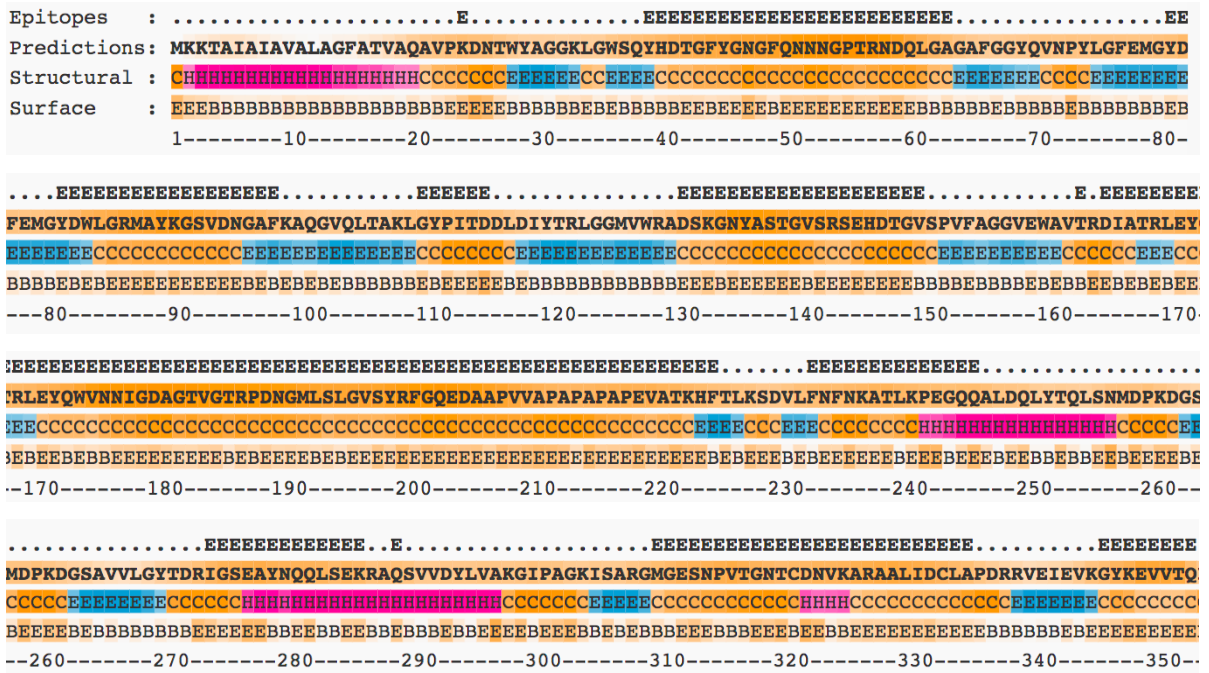


Figura 14. Resultados del servidor BebiPred 2.0 de OmpA. En la primera línea "Epitopes" se encuentran los epítomos predichos por el algoritmo del servidor, seguido se encuentra la sección "Structural", la cual nos indica la estructura secundaria (alfa hélice H, beta plegada E, random coil C). Por último, en la línea "Surface" nos da información de si determinada superficie de la proteína se encuentra expuesta (E) o no expuesta (B).

Para el caso de OmpC, se identificaron los siguientes epítomos: PEFGGDTYGSDNFLQS, SGEATNNGRGWSKQN, NATRAGSLGFANKAQN, GWSKQNGDGFGLTSLTY, YLASQYTQTYNATRAG, GDGFGTSLTYDIWDGI, DLYGKIDGLHYFSDDK, NLLDDNSFTRNAGIST, TDEQNSVPALGRGDNA, QYQGKNGSVSGEGATN, ESSSDQAWTRLAFAGL, MRVGVKGETQINDQLT, DGLNFALQYQGKNGSV, EYNVQANNTESSSDQA, GLHYFSDDKSVDGDQT, los cuales coincidieron en más de dos servidores. Por otra parte, también se identificaron otros epítomos que coincidían parcialmente en dos servidores: NFEVVAQYQDFGLRP, DVTSWTDVLPFEGGDT, QLTGYGQWEYNVQANN, LQSKGKDLERGYGDQD, GETQINDQLTGYGQWE, DGISAGFAYSHSKRTD, NGVATYRNSDFFGLVD, YVDYKINLLDDNSFTR. Así mismo, se muestra la posición de los epítomos en la secuencia proteica de la porina OmpC en las **Figura 15 y 16**.

### OmpC:



Figura 15. Epítomos dentro de la secuencia proteica de OmpC. Se utilizó el subrayado azul para el caso de los epítomos con la mejor coincidencia, y en gris aquellos con una sincronía parcial. Por otro lado, se utilizaron negritas y cursiva rosa para poder identificar epítomos traslapados.



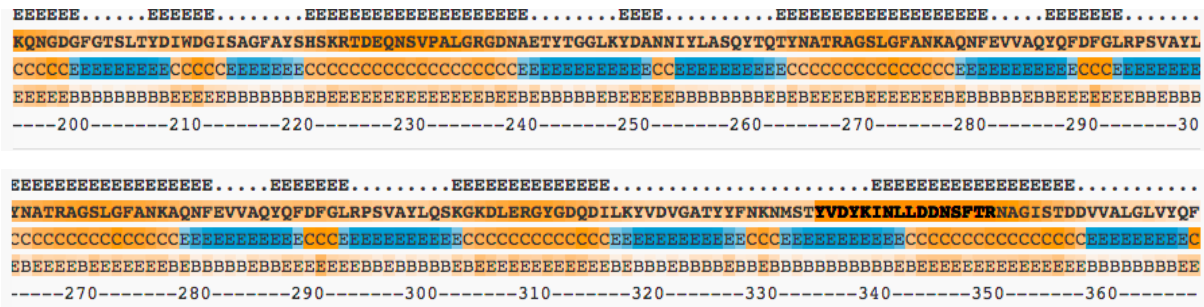


Figura 16. Resultados del servidor BebiPred 2.0 de OmpC. En la primera línea "Epitopes" se encuentran los epítomos predichos por el algoritmo del servidor, seguido se encuentra la sección "Structural", la cual nos indica la estructura secundaria (alfa hélice H, beta plegada E, random coil C). Por último, en la línea "Surface" nos da información de si determinada superficie de la proteína se encuentra expuesta (E) o no expuesta (B).

### Evaluación de la respuesta celular

Se evaluaron los sitios de reconocimiento para los MHC clase I y clase II. Para poder delimitar el problema, se buscaron los alelos predominantes en la población mexicana en el servidor Allele Frequency. Los resultados se pueden observar en las **Tablas 10 y 11**. Para su posterior investigación se tomaron en cuenta aquellos con una frecuencia mayor al 20% dentro de una población de 100.

### MCH clase I

**Tabla 10.** Alelos frecuentes en la población mexicana. MHC clase I

A*01	14.6%	A*02	65.8%	A*03	4.9%
A*01:01	18.2%	A*02:01	56.1%	A*03:01	11.4%
A*01:01:01	8.3%	A*02:01:01	56.9 %	A*03:01:01	1.4%
A*01:01:01:01	5%	A*02:01:01:01	55%	A*03:01:01:01	5%
		A*02:02	4.8%	A*03:01:02	1.4%
		A*02:06	12.2%		
A*11	7.3%	A*23	7.3%	A*24	40%
A*11:01	7.3%	A*23:01	7.1%	A*24:02	28.6%
A*11:01:01	2.8%	A*23:01:01	1.4%	A*24:02:01	29.2%
A*11:04	1.8%			A*24:02:01:01	45 %
A*25	3%	A*31	33.8%	A*32	4.9%
A*26	4.9%	A*31:01	16.7%	A*33	

A*29	4.9%	A*31:01:02	40%	A*36	9.8%
A*30	2.4%				4.8%
A*68	29.2%	B*07:02	18.2%	B*14:01	10.2%
A*68:01	33.3%	B*08:01	10.2%	B*14:02	9.8%
A*68:01:01	22%				
A*68:02	2.4%				
A*68:03	7.3%				
A*68:03:01	11.1%				
B*15	27.6%	B*18:01	12.2%	B*35	41.5%
B*15:01	13.1%	B*27	12.3%	B*35:01	35.7%
B*15:01:01	15.3%			B*35:01:01	29.2 %
B*15	3%			B*35:12	30%
B*37:01	4.9%	B*39	35.3%	B*40	20%
B*38:01	6.8%	B*39:01	29.8%	B*40:01	5.7%
		B*39:01:01	36.1%	B*40:02	20.2%
		B*39:02	6.4%		
		B*39:05	9.8%		
B*44	3 %	B*51	23%	B*52:01	9.8%
B*44:02	15.9%	B*51:01	23.9%	B*58:01	3.6%
B*48:01:01	18.1%	B*51:01:01	15.3 %	B*73	3%
C*03:02:01	19.4%	C*04:01:01	38.9%	C*08:01:01	23.6%
		C*05:01:01	4.2%	C*15:02:01	6.9%
		C*07:01:01	43.1%		

## MHC class II

**Tabla 11.** Alelos frecuentes en la población mexicana. MHC clase II

DPA1*01:03	89%	DQA1*01:01	22.5%	DQB1*02	24.2%
DPB1*03:01	16%	DQA1*01:02	20%	DQB1*02:01	34.7 %
DPB1*04:01	32%	DQA1*02:01	17.5 %	DQB1*02:02	18.2 %

DPB1*04:02	90.7%	DQA1*03:01	55.9%	DQB1*03:01	55%
		DQA1*04:01	30.7%	DQB1*03:01:01	34.7%
		DQA1*05:01	72.3 %	DQB1*03:02	54.2%
				DQB1*03:02:01	61.1%
DQB1*04:02	47.2%	DRB1*01:01	10.2 %	DRB1*11	23.2%
DQB1*05:01	22.5%	DRB1*03:01	15%	DRB1*11:01	10%
DQB1*05:01:01	11.1%	DRB1*04:03:01	11.1 %	DRB1*11:04	12.5%
DQB1*06:01	7.1%	DRB1*04:07	44%	DRB1*12:01	3.4%
DQB1*06:02	17.5%	DRB1*04:07:01	43.1%	DRB1*13	17%
DQB1*06:03	11.4%	DRB1*04:10	11%	DRB1*14:02	33.8%
		DRB1*07:01	17.5%	DRB1*14:06:01	15.3%
		DRB1*08:02	31.7%	DRB1*15:01	17.5%
		DRB1*08:02:01	47.2%	DRB1*16	14.9%
		DRB1*10	15%	DRB1*16:02	30.9%

A partir de los resultados anteriores, se hizo la búsqueda de epítomos para MCH de clase I y II más frecuentes en la población mexicana en la base de datos IEDB. Obteniéndose los siguientes resultados:

**OmpA MHC clase I:** YTDRIGSEAY, RRVEIEVKGY, RPDNGMLSL, YPITDDLDIY, KRAQSVVDY, SVVDYLVAK, SQYHDTGFY, GYTDRIGSEAY, GMLSLGVSYS, EVATKHFTLK, NTCDNVKAR, EVATKHFTL, ALDQLYTQL, GQQALDQLY, TDDLDIY, NVKARAAL, EHDTGVSPVF.

**OmpA MHC clase II:** MKKTAIAIAVALAGF, KKTAAIAIAVALAGFA, AVALAGFATVAQAVP, AIAVALAGFATVAQA, ALAGFATVAQAVPKD, NGAFKAQGVQLTAKL, GAFKAQGVQLTAKLG, IAIAVALAGFATVAQ, GVSPVAGGVEWAVT, FGQEDAAPVVAPAPA, VVDYLVAKGIPAGKI, EWAVTRDIATRLEYQ. Los epítomos se pueden visualizar en las **Figuras 17 y 18**.



VTQPAA

Figura 17. Epítomos de OmpA reconocidos por MHC de clase I y II dentro de la secuencia proteica. Se utilizó el subrayado rosa para el caso de los epítomos para MHC clase I y gris para MHC clase II. Por otro lado, se utilizaron negritas, cursiva y subrayado para poder identificar epítomos traslapados.

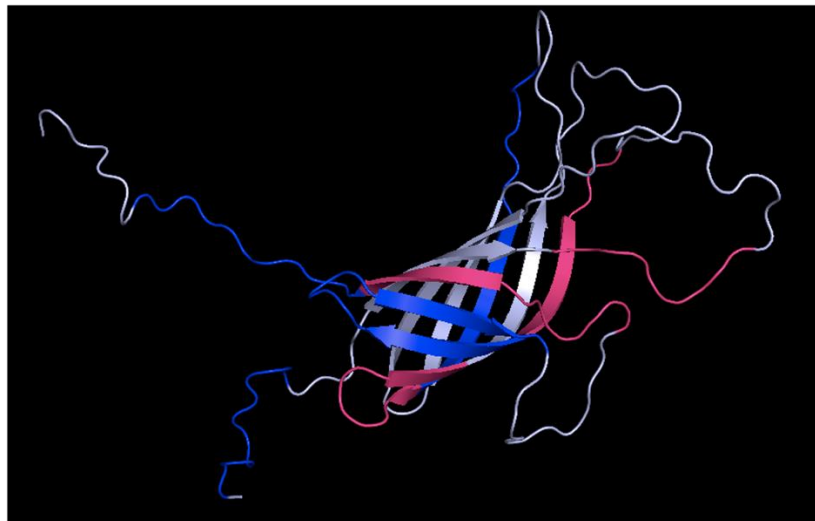


Figura 18. Epítomos de OmpA en PyMol. Se etiquetaron en color rosa los epítomos para MHC clase I, y en azul para MHC clase II.

**OmpC MHC clase I:** YVDVGATYY, STDDVVALGLVY, LASQYTQTY, FSDDKSVDGDQTY, TESSDQAW, KYVDVGATYYF, DEQNSVPAL, YGDQDILKY, LYGKIDGLHYF, SRANGVATY, RANGVATYR, TRLAFAGLKF, FEVVAQYQF, KYDANNIYL

**OmpC MHC clase II:** ALLVAGAANA AEIYN, VPALLVAGAANA AEI, LVPALLVAGAANA AE, IRTFLKVLSLLVPAL, RTFLKVLSLLVPALL, VPALLVAGAANA AEI, FLKVLSLLVPALLVA, IRTFLKVLSLLVPAL, YGSDNFLQSRANGVA, AWTRLA FAGL KFGDA, ATYYFNKNMSTYVDY, TGGLKYDANNIYLAS, DGISAGFAYSHSKRT·MLIRTFLKVLSLLVP. Los epítomos se pueden visualizar en las **Figuras 19 y 20**.

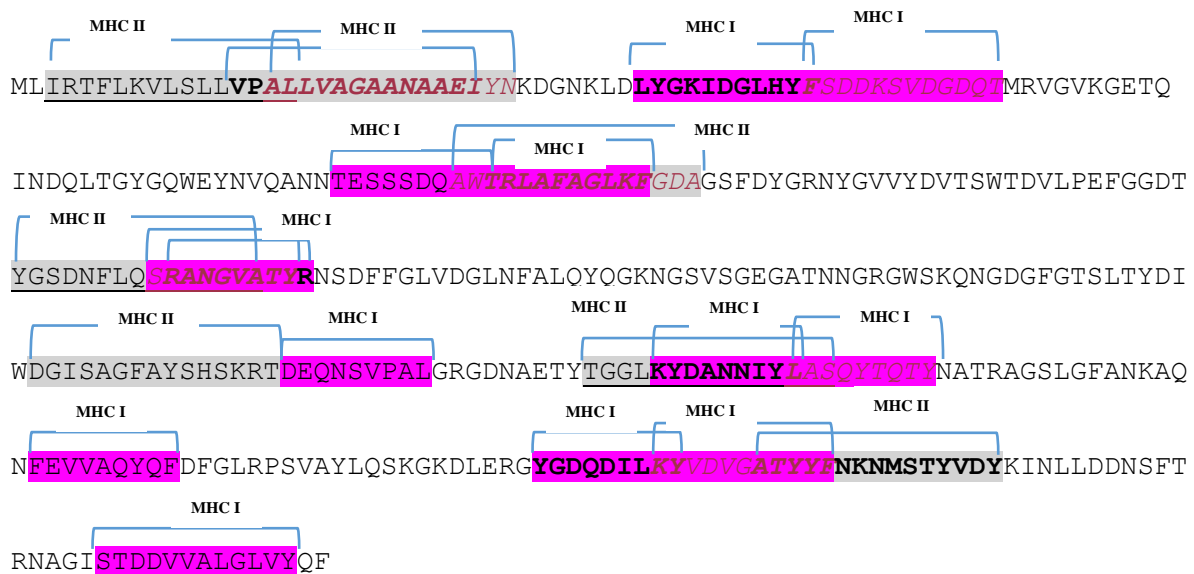


Figura 19. Epítomos de OmpC reconocidos por MHC de clase I y II dentro de la secuencia proteica. Se utilizó el subrayado rosa para el caso de los epítomos para MHC clase I y gris para MHC clase II. Por otro lado, se utilizaron negritas, cursiva y subrayado para poder identificar epítomos traslapados.

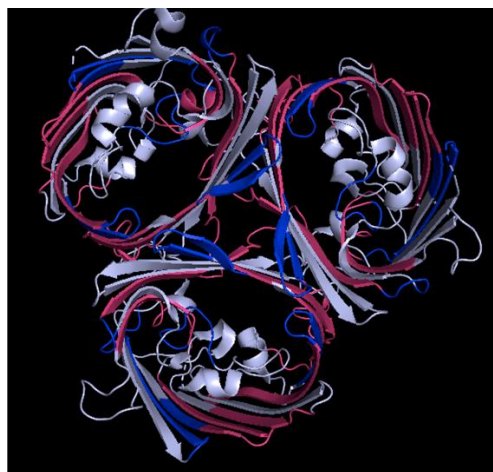


Figura 20. Epítomos de OmpC en PyMol. Se etiquetaron en color rosa los epítomos para MHC clase I, y en azul para MHC clase II.

## DISCUSIÓN

Dentro de la literatura científica se han reportado diversas metodologías que se basan en herramientas bioinformáticas para la búsqueda de nuevos diseños de vacunas contra bacterias Gram-negativas de importancia clínica, como es el caso de *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* (Girija et al., 2020; Farhadi et al., 2015).

Por una parte, *A. baumannii* es un patógeno que causa infecciones nosocomiales y contiene diversos factores de virulencia que le permite sobrevivir en nichos ambientales hospitalarios hostiles. Esta bacteria es un cocobacilo inmóvil, negativa para oxidasa y positiva para catalasa, que ha sido declarada por Organización Mundial de la Salud (OMS) como patógeno prioritario debido a su multi-resistencia a antibióticos, siendo parte del grupo ESKAPE (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) (Liu et al., 2018).

En un estudio reciente (Girija et al., 2020), se identificaron péptidos inmunogénicos en GacS de *A. baumannii*, utilizando un enfoque inmunoinformático. Es importante mencionar que GacS es una sensor quinasa relacionada principalmente con el metabolismo del citrato. Además, ha demostrado ser un factor clave en la regulación de la virulencia de *A. baumannii* (Cerqueira, 2014).

Los autores realizaron un estudio observacional *in silico* utilizando diversos servidores para predecir la inmuno-dominancia de epítomos en secuencias GacS FASTA recuperadas de UNIPROT. Ocuparon BepiPred-2.0 y ABCPred (servidor en función a una red neuronal recurrente que utiliza patrones de longitud fija), para predecir los posibles epítomos reconocidos por células B, donde obtuvieron 137 epítomos en total, y se eligieron aquellos con la puntuación más alta: 1, 0.996 y 0.811 (Girija et al., 2020). Es importante mencionar que la puntuación arrojada en la presente investigación de cada epítomo es similar: 0.94, 0.93, 0.9, 0.89, 0.88, 0.86, 0.82 para OmpA, y 0.95, 0.93, 0.92, 0.92, 0.9, 0.84, 0.83 para OmpC; esto nos puede indicar la presencia de epítomos inmunodominantes.

Adicionalmente, se utilizó el servidor IEDB para predecir posibles epítomos reconocidos por células T, arrojando péptidos inmunogénicos de diferentes longitudes, que fueron después seleccionados de acuerdo en su rango percentil. Se tomaron en cuenta aquellos menores o iguales a 0.2, puntuación que indica una alta afinidad. (Bui et al., 2007). A su vez, comparándolo con los resultados obtenidos en la presente investigación, los epítomos mostraban un rango percentil bajo, que iba desde 0.01 a 0.11 para MHC Clase I/OmpA, 0.06 a 2 para MHC Clase II/OmpA, 0.01 a 0.11 para MHC Clase I/OmpC y 0.21 a 2 para MHC/OmpC.

Se calcularon los parámetros fisico-químicos de los epítomos inmunogénicos de GacS en el servidor Espasy ProtParam. Dichos epítomos también fueron evaluados en servidores como; AlgPred, AntigenPro, SolPro y finalmente, se valoraron las interacciones peptídicas entre los epítomos seleccionados (E1-E11) y TLR-4, en función al número de enlaces de hidrógeno. El epítomo E5 fue puntuado como el mejor péptido con 14 enlaces de hidrógeno, seguido del epítomo E3 con 12 enlaces de hidrógeno y E1 con 10 enlaces hidrógeno (Girija et al., 2020). En el presente estudio se puede observar que las porinas OmpA y OmpC forman complejos con el receptor TLR 1/2, con 22 enlaces de hidrógeno en ambas proteínas, siendo éste un resultado prometedor.

En otro estudio se caracterizó molecularmente a la porina OmpA entre las cepas de *A. baumannii* resistentes, para predecir candidatos a vacunas inmunodominantes. Utilizaron el servidor IEBD, para predecir epítomos de MHC con un valor límite de detección de 0.75. Los epítomos de células T identificados con alelos HLA también fueron seleccionados por valores de rango percentil, mientras más bajo, mayor es la interacción que se muestra entre el péptido y las moléculas de MHC. Se eligieron los mejores 5 epítomos para MHC clase I: NADEEFWNY, YVLLGAGHY, HTDNTGPRK, VKSALVNEY y YTAGLNV. También se encontraron 5 epítomos para MHC clase II con rangos percentil 0.10, 0.17, 0.24, 0.24 y 0.27, reaccionando a los siguientes alelos: HLA-DRB1\*01:05, HLA-DRB1\*01:09, HLA-DRB1\*01:01 y HLA-DRB1\*01:03. (Sogasau D. et al., 2021).

Además, la secuencia OmpA de *A. baumannii* se sometió a la predicción de epítomos lineales en BepiPred 2.0, el cual es un servidor de predicción de epítomos que pueden unirse a los receptores de células B con base en diversas propiedades bioquímicas: composición de aminoácidos, la afinidad por el agua y las estructuras proteicas secundarias; se predijeron 8 epítomos de células B: QDSQHNNGGKDGNLNGPELQ,EYNQVKGDVDGASAGAEYKQKQI,FDGVNRGTRGTSEEGTLGNA,RATYNADDEF,LKPAAPVVEVAPVEPTPVAPQPQELT,KSNIKDYKPEIAK, KLSEYPNATARIEGHTDNTGPRKL y FAWDQPIADNKTKEGRA (Larsen et al., 2006). Todos los epítomos seleccionados fueron posteriormente sometidos a un análisis de antigenicidad por VaxiJenV2.0 (Magnan et al. 2010).

El análisis fisicoquímico de la proteína OmpA de *A. baumannii* fue muy prometedor, ya que los resultados mostraron un valor GRAVY de  $-0.388$ , que en la interpretación significa una propiedad hidrofílica. El índice alifático  $80.93$ , se utilizó para comprobar la termo estabilidad de los epítomos, los cuales resultaron ser estables, sugiriendo péptidos inmunodominantes prometedores (Sogasau D. et al., 2021). En el presente estudio, la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las porinas OmpA y OmpC de *K. pneumoniae* arrojó resultados similares: un GRAVY de  $-0.326$  para OmpA con un índice alifático de  $73.48$ . Un GRAVY de  $-0.465$  para OmpC con un índice alifático:  $70.33$ , resultando ser altamente estables.

Finalmente, se evaluó la interacción de los péptidos seleccionados con el receptor TLR-2. Se ha demostrado que TLR-2 puede reconocer una amplia variedad de moléculas complejas de todos los filos bacterianos, dentro del espectro de reconocimiento es capaz de identificar porinas, para éste fin utilizaron el servidor Galaxy web (Afgan E, et al., 2018).

Se encontró que el mejor epítomo fue E2 (EYNQVKGDVDGASAGAEYKQKQI), obteniendo el número más alto de enlaces Hidrógeno  $16$ , seguido de E1(QDSQHNNGGKDGNLNGPELQ) con  $13$  enlaces. La distancia en (Ángstroms) de los aminoácidos involucrados va desde  $1.57\text{Å}$  a  $3.18\text{Å}$  para cada epítomo. Los dos epítomos mostraron una afinidad de unión de  $-10.0$  kal/mol (Afgan E, et al., 2018). Las interacciones

de los complejos estudiados en este trabajo, además de ser prometedoras con el número de enlaces de hidrógenos formados, también tienen una afinidad de unión altamente favorable, siendo de -21.8 kcal/mol para OmpA y -22.2 kcal/mol para OmpC. Hablando de la distancia en Ångstroms entre las interacciones analizadas entre los complejos, se obtuvieron resultados convenientes para OmpA: 1.7Å, 2.5Å, 1.7Å, 3,4Å; y OmpC: 1.8Å, 1.6Å, 3.7Å, 3.5Å, 1.8Å.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el enfoque inmunoinformático ha servido para predecir la capacidad de ciertas proteínas de desencadenar una respuesta inmune. La elección de las proteínas empleadas ha sido el objeto de estudio más importante en trabajos recientemente publicados, dentro de los cuales destaca el uso de proteínas de la membrana externa (OMP) de bacterias Gram negativas, como posibles moléculas con propiedades antigénicas. Se ha descrito que las OMV de *K. pneumoniae* de tamaño nanométrico enriquecidas en OMP y LPS, han demostrado la inducción de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, que conducen a la protección contra el patógeno (Choi et al., 2019).

Asimismo, se reportó que una vacuna elaborada con proteínas de membrana externa de una cepa *K. pneumoniae* proporcionó una protección completa contra el patógeno. Las OMP de *K. pneumoniae* se consideran seguras como vacunas de subunidades y se ha probado y demostrado que inducen anticuerpos específicos del huésped y que son eficaces sin necesidad de adyuvantes adicionales en modelos animales (Babu et al., 2017).

Las proteínas de la membrana externa son una serie de canales que atraviesan la membrana externa de las bacterias Gram negativas, por lo tanto, permiten la penetración de una amplia gama de componentes, que son necesarios para el crecimiento y funcionamiento de la célula. Además de la función de transporte, actúan como factores de virulencia durante la infección bacteriana (Farhadi et al., 2015).

*K. pneumoniae* presenta tres principales proteínas de membrana externa: OmpA, OmpK35 y OmpK36. La familia OmpA de proteínas de membrana externa es un grupo de porinas expuestas a la superficie, modificables por calor y genéticamente relacionadas que se encuentran en un alto número de copias. Se caracterizan por un dominio N-terminal que

forma un barril  $\beta$  antiparalelo de ocho hebras, que está incrustado en la membrana externa. El dominio C-terminal es globular y está ubicado en el espacio periplásmico (Confer et al., 2013).

La proteína OmpA es una de las porinas mayoritarias, cuya función principal es ayudar a la resistencia contra los péptidos catiónicos antimicrobianos y a la evasión de la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares en *K. pneumoniae* (Llobet, 2009). Además, tienen funciones patogénicas importantes que incluyen la adhesión bacteriana, la invasión o la supervivencia intracelular, así como la evasión de las defensas del hospedero o estimuladores de la producción de citoquinas proinflamatorias (Krishnan y Prasadarao, 2012).

Recientemente, la porina OmpA ha demostrado ser un antígeno que participa en el mecanismo de defensa del huésped con la producción de citoquinas y el reclutamiento de neutrófilos, por lo que se le considera un buen candidato para la elaboración de vacunas. Dicha porina es capaz de inducir respuestas linfoproliferativas en células T CD4+: Th1/Th2, así como preparadores para epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) en ratones (Choi, 2019).

En respuesta a la estimulación antigénica, los linfocitos Th1 producen interleucina IL-2 e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y estimulan la inmunidad mediada por las células. Los linfocitos Th2 segregan IL-4, IL-5 e IL-10, favorecen la inmunidad humoral, e inducen la producción de anticuerpos (Rafael Botella, et al., 2002).

Además, OmpA del patógeno respiratorio humano *K. pneumoniae* puede funcionar como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) que interactúa con células dendríticas activadoras de TLR 2, células asesinas naturales (NK) y macrófagos (Chalifour et al., 2004).

En estudios *in vitro* se demostró que OmpA se une a las células epiteliales bronquiales humanas y, a través de la interacción con TLR2, estimula la activación celular a través de la vía NF- $\kappa\beta$ , lo que aumenta la expresión de ICAM-1 y la secreción de numerosos mediadores inflamatorios como IL-6 y una variedad de quimiocinas (Pichavant et al., 2003).

De igual importancia, las interacciones OmpA-TLR2 estimulan la liberación rápida de defensinas de las células NK, lo que provoca la alteración de la membrana bacteriana y la muerte. Se ha demostrado que las defensas inmunitarias innatas también pueden apuntar a la porina OmpA, donde el amiloide sérico A de proteína de fase aguda se dirige a OmpA, opsoniza la bacteria y mejora la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos (Shah et al., 2006).

Por otra parte, las proteínas OmpA y OmpK36, también conocida como OmpC (entrada UNIPROT numero de acceso: Q48473) constituyen las porinas de mayor importancia en *K. pneumoniae*, pues se encuentran ampliamente relacionadas con los mecanismos de patogenicidad de la bacteria; es a través de estas porinas que se difunden moléculas hidrofílicas, como los nutrientes hacia el interior de la bacteria, o son expulsadas hacia el exterior moléculas dañinas para la bacteria, como los antibióticos. Se ha demostrado que la ausencia de dichas porinas remodelan la superficie de *K. pneumoniae* e incrementan la adherencia de la bacteria a los macrófagos, lo que origina una mayor susceptibilidad a la fagocitosis (De la Cruz, 2020).

OmpK36 es producido por la mayoría de los miembros de *K. pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y también se conoce que contribuye a la resistencia o reduce la susceptibilidad a los carbapenémicos en cepas productoras de BLEE (Skurnik et al., 2010).

También se han utilizado otras porinas como OmpK17 y OmpK36 recombinantes como vacunas candidatas contra la infección pulmonar y la sepsis causadas por *K. pneumoniae* en modelos murinos con modesta eficacia protectora. Adicionalmente, investigaciones anteriores han reconocido una serie de Omps como OmpA, FepA, OmpC, OmpX y OmpW de *K. pneumoniae* que pueden inducir respuestas inmunitarias sólidas contra este patógeno (Kurupati et al., 2006).

En un estudio se propuso un enfoque *in silico* mediante el ensamblaje de epítomos de consenso y de alto rango de diversas porinas de gran importancia en *K. pneumoniae* y otras

Enterobacterias virulentas. Dichas porinas: OmpW, OmpA, OmpF, OmpC y OmpX fueron evaluadas mediante herramientas bioinformáticas para analizar su capacidad de producir respuestas inmunitarias (Farhadi et al., 2015).

En este sentido, el sitio web del servidor Immune Epitope Database (IEDB) proporciona herramientas para predecir los epítomos de células B y T. Otros servidores en línea como MetaMHCII, ProPred, MHCpred y SVMHC han sido útiles para encontrar epítomos de células T. Además, varios servidores web como DiscoTope y CBTOPE brindan acceso a la predicción de epítomos conformacionales en una secuencia de células B. DiscoTope predice epítomos discontinuos a partir de la estructura 3D de las proteínas mediante la aplicación de una combinación lineal de los valores normalizados de hidrofobicidad, estadísticas de aminoácidos, número de contactos y área de accesibilidad relativa al solvente para cada residuo (Kringelum et al., 2012).

En el mismo estudio, y a partir de la información recuperada de los diferentes servidores, se realizaron dos constructos conteniendo los mejores epítomos de las secuencias aminoacídicas, como posibles candidatos de vacuna contra el patógeno. Se predice que los epítomos de las construcciones diseñadas son capaces de inducir potencialmente respuestas inmunitarias eficaces. A la vez, se añadieron secuencias adyuvantes que también podrían desempeñar un papel fundamental en la mejora de la inmunogenicidad de las construcciones. Los epítomos para las células B seleccionados de las proteínas OmpA y OmpC para el diseño del constructo fueron GRMAYKGSVDNGAFK y YFSSDSKKDGDQT respectivamente. De igual forma se predijeron T CD4<sup>+</sup> utilizando servidores como MetaMHC, y Propred, específicos para DRB1\*0101, encontrándose los siguientes epítomos para OmpA YQVNPYLGF, YRFGQEDAA, ITDDLDIY, LEYQWVNNI, GFEMGYDW; y para OmpC YGKIDGLHY, FGDAGSFDY, FLQSRANGV, TYVDYKINL, YLQSKGKDL (Farhadi et al., 2015).

Una vez elaborados los constructos fueron sometidos a una evaluación de sus propiedades fisicoquímicas en ExPASy, arrojando un punto isoeléctrico (pI) de 5.59 y 6.03, indicando que los dos constructos son de naturaleza acídica en la naturaleza, un índice de inestabilidad 27.30 y 38.42, indicando que los constructos son altamente estables, un GRAVY -0.285 y -

0.369 respectivamente, afirmando una mejor interacción con las moléculas de agua a su alrededor y un índice alifático de 90.09 y 76.18 respectivamente, indicando que el constructo es estable en un amplio rango de temperaturas (Farhadi et al., 2015). Adicionalmente podemos comparar que las proteínas evaluadas en la presente tesis, mostraron un pI de 6 y 4.62 para OmpA y OmpC respectivamente, indicando de igual manera una naturaleza acídica, con un índice de inestabilidad de 24.24 para OmpA y 20.29 para OmpC, siendo proteínas altamente estables.

En otro estudio, se ha demostrado la capacidad *in vitro* de una proteína recombinante conformada por porciones de las proteínas OmpA y OmpK36 de *Klebsiella pneumoniae* denominada r-AK36, demostrando ser altamente inmunogénica en diferentes cepas. La eficacia de este constructo fue evaluada en modelos de ratón BALB/c, con la finalidad de estudiar más a fondo la respuesta inmune desencadenada. Los ratones inmunizados se vio un incremento en los anticuerpos anti-r-AK36. Se observó la respuesta de Th-2, indicado por la predominancia de la inmunoglobulina IgG1 y de Th-1 por los niveles de IgG2b (Babu et al., 2017).

En \* evaluó la reactividad de los anticuerpos anti-r-AK36 con OMPs nativas de diferentes *K. pneumoniae* mediante un análisis de Western blot. Los anticuerpos mostraron una fuerte reactividad contra las porinas nativas OmpA y OmpK36. También se observó que el constructo indujo una proliferación significativa de esplenocitos en ratones previamente inmunizados. La polarización Th2 sugirió el rol de la linfocina IL-4 mediando la producción de IgG1. A su vez, IL-2 es una citocina que promueve la diferenciación de las células T a células efectoras y de memoria, la cual fue producida de manera significativa en ratones previamente inmunizados. IL-2 juega un rol fundamental en el desarrollo de células efectoras y de memoria, gracias a que expande el número número y la función de los clones de células T seleccionados por antígeno. También se encontró una producción significativa de IFN- $\gamma$  en los esplenocitos de los ratones inmunizados. Los anticuerpos Anti-r-AK36 pueden además inhibir la formación de biopelículas al recubrir la superficie de los patógenos y marcándolo para su destrucción (Babu et al., 2017).

Por otro lado, además de aplicar enfoques inmuno-informáticos para la generación de nuevas vacunas en bacterias, también se han publicado recientemente metodologías similares para predecir la respuesta inmune de posibles vacunas contra virus, especialmente para SARS-CoV-2. En un estudio se predijeron epítomos de células T derivados de células B de una secuencia completa de aminoácidos de la proteína S del SARS-CoV-2 descargada en formato FASTA de NCBI. Para la predicción de epítomos de células B ocuparon el servidor ABCpred, y para aquellos epítomos de células T (MHC I y MHC II), se ocuparon los servidores Propred1, MHCpred y Vaxijen v.2.0. Una vez elegidos los epítomos con mejores resultados, realizaron un constructo llamado MEBP (Saha et al., 2021).

Se evaluaron parámetros fisicoquímicos del constructo utilizando el servidor ExPASy ProtParam; resultando en un peso molecular de 19,572.85 Da, punto Isoeléctrico 9.66, un índice alifático de 80; indicando una naturaleza termoestable del constructo a varias temperaturas. Se calculó además el valor de la gran media de hidropaticidad (GRAVY) de -0.111 revelando una naturaleza hidrófila, siendo muy probable que interactúe con otras moléculas porteicas. Las observaciones anteriores demuestran que el constructo MEBP está dentro del rango óptimo y tiene las propiedades de una vacuna eficiente (Ahmad et al. 2020).

Se realizó un acoplamiento molecular para predecir la afinidad de unión y los patrones de interacción entre el constructo contra las formas monoméricas de diferentes TLR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR8). El acoplamiento proteína-proteína se llevó a cabo utilizando el servidor ClusPro 2.0 (Kozakov et al. 2017).

El servidor utiliza tres pasos consecutivos como acoplamiento de cuerpo rígido, agrupación de estructura de energía más baja y refinamiento estructural por minimización de energía (Sayed et al. 2020). ClusPro (<https://cluspro.org>) es una herramienta ampliamente utilizada para el acoplamiento proteína-proteína. Está basado en el acoplamiento directo de dos proteínas que interactúan, y busca encontrar la estructura del complejo objetivo ubicado en el mínimo de energía libre de Gibbs en el espacio conformacional (Vajida et al., 2009).

El programa realiza tres pasos computacionales: (1) acoplamiento de cuerpo rígido mediante el muestreo de miles de millones de conformaciones, (2) agrupación basada en la desviación cuadrática media (RMSD) de las 1000 estructuras de energía más baja generadas para encontrar las agrupaciones más grandes que representarán los modelos más probables del complejo, y (3) refinamiento de estructuras seleccionadas usando minimización de energía. ClusPro se introdujo en 2004, pero desde entonces se ha modificado y ampliado sustancialmente, y su uso ha ido aumentando a lo largo del tiempo. Para junio de 2016 el servidor tenía más de 17.000 usuarios y completó más de 172.000 cálculos de acoplamiento. Los modelos construidos por el servidor se han informado en más de 400 publicaciones (Kozakov et al., 2017).

Las energías de los modelos producidos en ClusPro para cada TLR fueron las siguientes: -1126.1 para TLR2, -995.4 TLR3, -977.4 TLR4, -1106.1 TLR5, -1068.9 TLR7, -1149.9 TLR8. (Saha et al., 2021). Comparando los resultados con los obtenidos en los modelos TLR 1/2 - OmpA y TLR1/2 - OmpC fueron de -1286.5 y -1447.2 respectivamente, mostrando modelos con menores puntuaciones, indicando mayor afinidad del complejo.

El mejor complejo acoplado se seleccionó en función del tamaño del grupo junto con la energía más baja. La afinidad de unión o la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) se predijo utilizando el servidor web PRODIGY. Se llevó a cabo un análisis de interacción y la visualización del complejo utilizando PDBsum y Chimera v1.14, respectivamente. Todos los complejos formados con los diferentes TLRs fueron energéticamente favorables, indicado por el valor negativo  $\Delta G$  (kcal/mol). Los resultados de PRODIGY para cada modelo fueron los siguientes: -17.6 kcal/mol para TLR2, -18.7 kcal/mol TLR3, -19.9 kcal/mol TLR4, -11.8 kcal/mol TLR5, -15.2 kcal/mol TLR7 y -18.6 kcal/mol para TLR8 (Saha et al., 2021). De igual manera, los resultados de PRODIGY para OmpA y OmpC fueron altamente prometedores con -21.8 kcal/mol -22.2 OmpC kcal/mol, respectivamente.

El análisis de interacciones en PDBsum mostró estudio de interacción extenso, incluyendo puentes salinos: 7, 5, 2, 5, 2, 5, enlaces de hidrógeno 26, 24, 20, 19, 15, 15 e interacciones no covalentes 284, 199, 242, 199, 248, 193, para TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR8

respectivamente (Saha et al., 2021). OmpA resultó tener 2 puentes salinos, 22 enlaces hidrógeno y 285 interacciones no covalentes, mientras que OmpC tuvo 1 puente salino, 22 enlaces hidrógeno y 322 enlaces no covalentes.

En otro estudio bioinformático dirigido a SARS-CoV-2, se predijeron posibles epítomos de células B y T. Para esto ocuparon la base de datos de epítomos inmunes (IEDB), que es un depósito de información relacionada con epítomos, seleccionada de la literatura científica en el contexto de enfermedades infecciosas, alergias y autoinmunidad. Este servidor también proporciona herramientas y algoritmos bioinformáticos que permiten el análisis de datos de epítomos potenciales a partir de secuencias novedosas (Vita et al., 2019).

Para la predicción de células T se tomaron en cuenta los alelos con alta frecuencia en la población mundial: HLA-A\*01:01, HLA-A\*02:01, HLA-A\*03:01, HLA-A\* 11:01, HLA-A\*23:01, HLA-A\*24:02, HLA-B\*07:02, HLA-B\*08:01, HLA-B\*35:01, HLA-B\*40:01, HLA-B\*44:02, HLA-B\*44:03, dando como resultado epítomos de 8 a 14 mers. Finalmente, utilizaron el servidor BebiPred 2.0 y Discotope 2.0 para el análisis de predicción de células B, donde la glicoproteína de superficie tuvo el mayor número de epítomos de células B pronosticados, seguida de la glicoproteína de membrana y la fosfoproteína de la nucleocápside (Grifoni et al., 2020).

## CONCLUSIONES

Las vesículas de la membrana externa (OMV's) de las bacterias Gram negativas, son estructuras de gran interés biotecnológico, pues se ha demostrado que albergan una gran variedad de factores de virulencia que generalmente sirven para propiciar el ambiente y las condiciones adecuadas para las bacterias en el proceso de infección. No obstante, se puede tomar ventaja de estas estructuras gracias a sus propiedades fisicoquímicas e inmunogénicas. Dentro del grupo de las bacterias Gram negativas, *Klebsiella pneumoniae* es actualmente de gran interés clínico, pues ha demostrado ser un patógeno oportunista que se ha vuelto multi-resistente a una gran variedad de antibióticos. Hoy en día muchos estudios han enfocado su atención en la búsqueda de nuevas alternativas de vacunas que sean más eficientes y seguras en contra de *K. pneumoniae*.

En la presente tesis se realizaron análisis bioinformáticos para el estudio de dos proteínas encontradas en las OMVs de *K. pneumoniae*, que están involucradas en los mecanismos de patogenicidad. Dichas proteínas (OmpA y OmpC) demostraron tener una gran capacidad para activar al sistema inmunológico innato y adaptativo. Se utilizaron diversas plataformas inmunoinformáticas, y se realizó un Docking molecular para el análisis de la interacción entre las proteínas y el sistema inmune.

OmpA y OmpC muestran tener una gran estabilidad gracias a sus propiedades fisicoquímicas, como son el índice alifático, punto isoeléctrico (pI), índice de inestabilidad y valores de GRAVY; a su vez logran tener una afinidad de unión altamente favorable con el receptor humano TLR 1/2, siendo de -21.8 kcal/mol para OmpA y -22.2 kcal/mol para OmpC. De igual forma, se encontraron un número considerable de epítomos reconocidos por células B y T con resultados promisorios, que aseguran la presencia de epítomos inmunodominantes. Todos estos resultados en conjunto nos indican que OmpA y OmpC de *K.pneumoniae* son alternativas prometedoras para la elaboración y el diseño de nuevas vacunas.

## PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones presentados en esta Tesis, las perspectivas se pueden orientar en dos direcciones. En primera instancia se pueden realizar más ensayos *in silico* utilizando otros servidores que permitan terminar de caracterizar las proteínas descritas en este trabajo (OmpA y OmpC/OmpK36), así como la interacción con los componentes de la respuesta inmune del hospedero.

Es importante probar otros servidores que realicen Docking molecular proteína-proteína, con la finalidad de obtener más resultados. Un servidor destacado es WHISCY, el cual es capaz de predecir interfaces proteína-proteína basado principalmente en la conservación y tomando en cuenta información estructural. Otro servidor notable que puede ser utilizado es HADDOCK; una plataforma integrativa para el modelamiento de complejos biomoleculares. Dentro del servidor ClusPro, es posible también realizar un Docking molecular de complejos Anticuerpo-proteína; utilizando las opciones avanzadas en “Antibody mode”.

De igual forma, es de suma relevancia evaluar la reacción de las proteínas para comprobar que no habrá reacciones alérgicas en el organismo, utilizando servidores como AllerTOP v. 2.0 y AllergenFP v.1.0. Asimismo, se puede utilizar el servidor VaxiJen; una plataforma sobresaliente con gran número de publicaciones, empleado para la predicción de antígenos y subunidades de vacunas.

Por otro lado, para la mejor predicción de epítomos para células B, es posible también utilizar el servidor DiscoTope, el cual ayuda a predecir estructuras de epítomos celulares en 3D. Este servidor es capaz de predecir epítomos discontinuos aplicando una combinación lineal de valores normalizados de hidrofobicidad, el tipo de aminoácido, la cantidad de contactos, y el área relativa de accesibilidad de cada residuo. Otros servidores en línea como MetaMHCII, ProPred, MHCpred y SVMHC han sido prominentes en las investigaciones enfocadas a encontrar epítomos de células T.

En segunda instancia, se deben llevar a cabo experimentos de laboratorio, con la finalidad de obtener, purificar y evaluar las proteínas de interés. Se pueden obtener las proteínas sobre expresando los genes *ompA* y *ompC* en *K. pneumoniae*, promoviendo la formación de OMV enriquecidas con las porinas OmpA y OmpC. Una vez extraídas las OMV de *K. pneumoniae*, será posible purificar y evaluar las proteínas de interés.

Otra alternativa es la producción recombinante de dichas porinas. Conociendo la secuencia nucleotídica, es posible clonar los genes *ompA* y *ompC*. Al ser proteínas de 38072.64 Da  $\approx$  1028.99 kb y 40549.37  $\approx$  1095.929 kd respectivamente, es necesario utilizar un vector adecuado para la clonación y sobreexpresión de las proteínas. Una vez purificadas, es posible inmunizar en el modelo murino para la producción de anticuerpos y evaluarlos posteriormente a través de Western Blot para el reconocimiento de OmpA y OmpC, así como un ensayo ELISA para evaluar la presencia de IgG y saber si los títulos arrojados son prometedores.

## REFERENCIAS

Afgan E, Baker D, et al. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:W537–W544. Doi: 10.1093/nar/gky37

Ahmad S, Navid A, Farid R, et al. (2020). Design of a novel multi epitope-based vaccine for pandemic Coronavirus disease (COVID-19) by vaccinomics and probable prevention strategy against avenging zoonotics. *Eur J Pharm Sci.*

Andrade Verónica, Silva Jesús. (2004). Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Publica Mex* 2004;46:524-528

Ashurst JV, Dawson A. (2022). *Klebsiella Pneumonia*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>

Babu, L., Uppalapati, S. R., Sripathy, M. H., & Reddy, P. N. (2017). Evaluation of Recombinant Multi-Epitope Outer Membrane Protein-Based *Klebsiella pneumoniae* Subunit Vaccine in Mouse Model. *Frontiers in Microbiology*, 8. Doi:10.3389/fmicb.2017.01805

Baeza, N., Mercade, E. (2020). Relationship Between Membrane Vesicles, Extracellular ATP and Biofilm Formation in Antarctic Gram-Negative Bacteria. *Microb Ecol*. Doi: 10.1007/s00248-020-01614

Bauman SJ, Kuehn MJ (2006). Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect* 8(9–10):2400–2408. Doi: 10.1016/j.micinf.2006.05.001

Bielig H, Rompikuntal PK, Dongre M, Zurek B, Lindmark B, Ramstedt M, Wai SN, Kufer TA (2011). NOD-like receptor activation by outer membrane vesicles from *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 strains is modulated by the quorum-sensing regulator HapR. *Infect Immun* 79 (4):1418–1427. Doi: 10.1128/IAI.00754-10

Blenkiron C, Simonov D, Muthukaruppan A, Tsai P, Dauros P, Green S, Hong J, Print CG, Swift S, Phillips AR (2016) Uropathogenic *Escherichia coli* releases extracellular vesicles that are associated with RNA. *PLoS One* 11(8):e0160440. Doi:10.1371/journal.pone.0160440

Buenahora, R. D. R., Zarate, D. E. B., Sanchez, D. C. C., Sarmiento, D. C. C., & Gomez, C. C. (2016). *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. *MéD. UIS*, 29(2), 113-35.

Bui HH, 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. PMID: 17897458; PMCID: PMC2233646. Doi: 10.1186/1471-2105-8-361

Cerqueira GM, Kostoulias X, Khoo C, Aibinu I, Qu Y, Traven A, Peleg AY. (2014). A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. PMID: 24431277. Doi: 10.1093/infdis/jiu024

Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J.F., Blaecke, A., Malissard, M., N’Guyen, T., Thieblemont, N., Delneste, Y. (2004). Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alphadefensin production. *Blood* 104, 1778–1783.

Chang, J.-M., Su, E. C.-Y., Lo, A., Chiu, H.-S., Sung, T.-Y., & Hsu, W.-L. (2008). PSLDoc: Protein subcellular localization prediction based on gapped-dipeptides and probabilistic latent semantic analysis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 72(2), 693–710. Doi:10.1002/prot.21944

Chatterjee S.N., Chaudhuri K. (2012) Outer Membrane Vesicles: Interaction with Prokaryotes and Eukaryotes. In: *Outer Membrane Vesicles of Bacteria*. SpringerBriefs in Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. Doi: 10.1007/978-3-642-30526-9\_6

Choi, M., Tennant, S. M., Simon, R., & Cross, A. S. (2019). Progress towards the development of *Klebsiella* vaccines. *Expert review of vaccines*, 18(7), 681–691. Doi: 10.1080/14760584.2019.1635460

Choi JW, Kim SC, Hong SH, Lee HJ (2017) Secretable small RNAs via outer membrane vesicles in periodontal pathogens. *J Dent Res* 96(4):458–466. Doi: 10.1177/002203451668507

Confer W. Confer, Sahlu Ayalew. (2013) The OmpA family of proteins. Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary Microbiology*, Volume 163, Issues 3–4, Pages 207–222, ISSN 0378-1135, Doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.019

De la Cruz, Miguel A. y Mejía-Ventura, Jazmín. (2020) Efecto de las proteínas nucleoides en la transcripción de factores de virulencia en *Klebsiella pneumoniae*. Mens. Bioquim. 44 96-106. ISSN-0188-137X Centro Médico Nacional Siglo XXI.

DiRienzo, J. M., Nakamura, K., & Inouye, M. (1978). The Outer Membrane Proteins of Gram-Negative Bacteria: Biosynthesis, Assembly, and Functions. Annual Review of Biochemistry, 47(1), 481–532. Doi:10.1146/annurev.bi.47.070178.002405

Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D (2004) Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. Microb Pathog 36(6):319–325

Eliopoulos, G. M., Maragakis, L. L., & Perl, T. M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clinical infectious diseases, 46(8), 1254-1263.

Ellis TN, Kuehn MJ (2010) Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. Microbiol Mol Biol Rev 74(1):81–94. Doi: 10.1128/MMBR.00031-09

Farhadi, T., Nezafat, N., Ghasemi, Y., Karimi, Z., Hemmati, S., & Erfani, N. (2015). Designing of Complex Multi-epitope Peptide Vaccine Based on Omps of *Klebsiella pneumoniae*: An In Silico Approach. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 21(3), 325–341. Doi:10.1007/s10989-015-9461-0

Fundora Hernández, H., Puig Peña, Y., Chiroles Rubalcaba, S., Rodríguez Bertheau, A. M., Gallardo Díaz, J., & Milián Samper, Y. (2013). Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 51(1), 84-96.

Gasteiger E., et al. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press

Grifoni, A., Sidney, J., Zhang, Y., Scheuermann, R. H., Peters, B., & Sette, A. (2020). Candidate Targets for Immune Responses to 2019-Novel Coronavirus (nCoV): Sequence Homology- and Bioinformatic-Based Predictions. SSRN, 3541361. Doi: 10.2139/ssrn.3541361

Guo SJ, Ren S, Xie YE. (2018). Evaluation of the Protective Efficacy of a Fused OmpK/Omp22 Protein Vaccine Candidate against *Acinetobacter baumannii* Infection in Mice. Biomed Environ Sci. PMID: 29606195. Doi:10.3967/bes2018.019.

Huang, W., et al. (2016). Employing Escherichia coli-derived outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infection. Scientific Reports, 6(1). Doi:10.1038/srep37242

Hu, G., Chen, X., Chu, W. *et al.* (2022). Immunogenic characteristics of the outer membrane phosphoprotein as a vaccine candidate against *Klebsiella pneumoniae*. *Vet Res* **53**, 5 Doi.org/10.1186/s13567-022-01023-2

Ismail S, Hampton MB, Keenan JI. (2003). *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect Immun* 71 (10):5670–5675

Jagannadham, M.V., Chattopadhyay, M.K. (2015). Role of outer membrane vesicles of bacteria. *Reson* 20, 711–725. Doi: 10.1007/s12045-015-0228-x

Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 375–387. Doi:10.1038/nri3837

Kawai T, Akira S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5):373–384

Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Vajda S. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins*. PMID: 23996272; PMCID: PMC3934018. Doi: 10.1002/prot.24403

Kozakov, et al. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255–278. Doi:10.1038/nprot.2016.169

Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. (2012). Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol*. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1002829

Krishnan, S., Prasadarao, N.V. (2012). Outer membrane protein A and OprF – versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS J*. 279, 919–930.

Kurupati PBK, Kumarasinghe G, Poh CL. (2006). Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae clinical* strain by immunoproteome analysis. *Proteomics* 6(3):836–844. Doi:10.1002/pmic.200500214

Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006;2:2. Doi: 10.1186/1745-7580-2-2.

Lee, E.-Y., Choi, D.-S., Kim, K.-P., & Gho, Y. S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 535–555. Doi:10.1002/mas.20175

Leidner, Dorothy E. (2018). "Review and Theory Symbiosis: An Introspective Retrospective," *Journal of the Association for Information Systems*, 19(6). Available at: <https://aisel.aisnet.org/jais/vol19/iss6/1>

Liu C., Chang Y., Xu Y., Luo Y., Wu L., Mei Z., et al. (2018). Distribution of virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. Doi: 10.18632/oncotarget.24651

Liu Q., Zhang X., et al. (2016). Outer membrane vesicles from flagellin-deficient *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* induce cross-reactive immunity and provide cross-protection against heterologous *Salmonella* challenge. PMID: 27698383. Doi: 10.1038/srep34776.

Llobet, E., March, C., Giménez, P., & Bengoechea, J. A. (2009). *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(1), 298–302. Doi.org/10.1128/AAC.00657-08

López Vargas Jaime Alberto , Echeverri Toro Lina María (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. IATREIA / VOL 23/.

Lusta, K.A., Kozlovskii, Y.E. (2011). Outer membrane nanovesicles of gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* . Microbiology 80, 519. Doi: 10.1134/S0026261711040138

Magnan CN, Zeller M, Kayala MA, Vigil A, Randall A, Felgner PL, Baldi P. (2010). High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. Bioinformatics. Doi: 10.1093/bioinformatics/btq551

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. North American journal of medical sciences, 4(9), 429.

Martínez, J. L. (2014). Short-sighted evolution of bacterial opportunistic pathogens with an environmental origin. Frontiers in Microbiology, 5. Doi:10.3389/fmicb.2014.00239

Martora, F., et al. (2019). Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 103719. Doi:10.1016/j.micpath.2019.103719

Mashburn LM, Whiteley M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437(7057):422–425. Doi:10.1038/nature03925

McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2006). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x

Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero. (2004). Puebla, Pue., México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Medzhitov R, Janeway CA Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3):295–298

Memish, Z. A., Shibl, A. M., Kambal, A. M., Ohaly, Y. A., Ishaq, A., & Livermore, D. M. (2012). Antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacteria in Saudi Arabia. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(7), 1701-1705.

Mora Xavier. (2012). Diferenciando bacterias gram + y bacterias gram -. *PATOLOGÍA*. Sitio web: <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>

Neil A. Whitehead, Anne M.L. Barnard, Holly Slater, Natalie J.L. Simpson, George P.C. (2001). Salmond, Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, Pages 365–404. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x

Parra-Medina, R., & Polo, J. F. (2017). Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Una mirada desde la patología quirúrgica. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 26(4), 202-207.

Park AJ, Murphy K, Surette MD, Bandoro C, Krieger JR, Taylor P, Khursigara CM. (2015). Tracking the dynamic relationship between cellular systems and extracellular subproteomes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Proteome Res* 14(11). Doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00262

Pichavant, M., Delneste, Y., Jeannin, P., Fourneau, C., Bricet, A., Tonnel, A.B., Gosset, P. (2003). Outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *J. Immunol.* 171, 6697–6705.

Portas Torres Irene. (2015). Implicación de las vesículas de membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* en la resistencia frente a péptidos antimicrobianos. *Grau de biologia Any acadèmic 2014-15. Universitat de les Illes Balears.*

Pugsley A. (2021). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *ASM Journals* Vol 57, No 1. Doi: 10.1128/mr.57.1.50-108.1993

Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE.

Roier, S., Zingl, F., Cakar, F. et al. (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun* 7. Doi: 10.1038/ncomms10515

Saha R, Ghosh P, Burra VLSP. Designing a next generation multi-epitope based peptide vaccine candidate against SARS-CoV-2 using computational approaches. *3 Biotech.* 2021 Feb;11(2):47. Doi: 10.1007/s13205-020-02574-x.

Sayed SB, Nain Z, Khan MSA, et al. (2020). Exploring virus proteome to design a multi-epitope vaccine through immunoinformatics and immune simulation analyses. *Int J Pept Res Ther*. Doi: 10.1007/s10989-019-10003-8.

Schwechheimer, C., Kuehn, M. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. (2015). *Nat Rev Microbiol* 13, 605–619. Doi: 10.1038/nrmicro3525

Shah, C., Hari-Dass, R., Raynes, J.G. (2006). Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 108, 1751–1757.

Shin HS, Gedi V, Kim JK, Lee DK. (2019). Detection of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles using DNA aptamers. *Sci Rep*. Doi: 10.1038/s41598-019-49755-0.

Skurnik, D., Lasocki, S., Bremont, S., Muller-Serieys, C., Kitzis, M. D., Courvalin, P., et al. (2010). Development of ertapenem resistance in a patient with mediastinitis caused by *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J. Med. Microbiol.* 59, 115–119. Doi: 10.1099/jmm.0.012468-0

Smiline Girija A. S. (2020). Delineating the Immuno-Dominant Antigenic Vaccine Peptides Against *gacS*-Sensor Kinase in *Acinetobacter baumannii*: An *in silico* Investigational Approach. *Frontiers in microbiology*, 11, 2078. Doi: 10.3389/fmicb.2020.02078

Sogasu D, Girija ASS, Gunasekaran S, Priyadharsini JV. (2021). Molecular characterization and epitope-based vaccine predictions for ompA gene associated with biofilm formation in multidrug-resistant strains of *A.baumannii*. *In Silico Pharmacol*. PMID: 33520594; PMCID: PMC7829033. Doi: 10.1007/s40203-020-00074-7

Thoma, J., Manioglu, S., et al. (2018). Protein-enriched outer membrane vesicles as a native platform for outer membrane protein studies. *Commun Biol* 1, 23. Doi: 10.1038/s42003-018-0027-5

Tiku, V., et al. (2021). Outer membrane vesicles containing OmpA induce mitochondrial fragmentation to promote pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. Scientific Reports. Doi:10.1038/s41598-020-79966-9

Turner L, Bitto NJ, Steer DL, Lo C, D'Costa K, Ramm G, Shambrook M, Hill AF, Ferrero RL, Kaparakis-Liaskos M. (2018). *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein content. Front Immunol 9:1466.

Tran, F., Boedicker, J.Q. (2017). Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. Sci Rep 7, 8813. Doi: 10.1038/s41598-017-07447-7

Vajda S, Kozakov D. (2009). Convergence and combination of methods in protein-protein docking. Curr Opin Struct Biol. PMID: 19327983; PMCID: PMC2763924. Doi: 10.1016/j.sbi.2009.02.008

Valdés Espino D, Sosa Díaz J, Sosa Díaz RY. (2018). *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno de alta prioridad para la fabricación de nuevos antibióticos. Matanzas. Rev Méd Electrón

Vaughan, T. E., et al. (2006). Proteomic analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine antigens. Vaccine, 24(25), 5277–5293. Doi:10.1016/j.vaccine.2006.03.013

Vita R., Mahajan S., Overton J.A., Dhanda S.K., Martini S., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Sette A., and Peters B. (2019). The Immune Epitope Database (IEDB). Nucleic Acids Res. 47(D1), D339–D343. Doi: 10.1093/nar/gkyl006

Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, Peters B. (2010). Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. BMC Bioinformatics. 11:568.

Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van Baarlen P. (2011). Epithelial crosstalk at the microbiota- mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(Suppl 1):4607–4614

Zavan L, Bitto NJ, Johnston EL, Greening DW, Kaparakis-Liaskos M. (2019). *Helicobacter pylori* growth stage determines the size, protein composition, and preferential cargo packaging of outer membrane vesicles. *Proteomics*. Doi: 10.1002/pmic.201800209

Zavan L., Bitto N.J., Kaparakis-Liaskos M. (2020). Introduction, History, and Discovery of Bacterial Membrane Vesicles. In: Kaparakis-Liaskos M., Kufer T. (eds) *Bacterial Membrane Vesicles*. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-030-36331-4\_1

## ANEXOS

### Secuencias en formato FASTA de bacterias Gram negativas utilizadas en BLASTp

#### *Acinetobacter baumannii*

```
>AXV53527.1 OmpA [Acinetobacter baumannii]
MKLSRIALATMLVAAPLAAANAGVTVTPLLLGYTFQDSQHNNGGKDGNLTNSPELQDDLFVGAALGIELT
PWLGFEEAYNQVKGVDVGASAGAAYKQKQINGNFYVTSDLITKNYDSKIKPYVLLGAGHYKYDFDGVNRG
TRGTSEEGTLGNAGVGAFWRLNDALSLRTEARATYNADEEFWNYTALAGLNVVLGGHLKPAAPVVEVAPV
EPTPVAPQPQELTEDLNMELRVFFDTNKSNIKDQYKPEIAKVAEKLSEYPNATARIEGHTDNTGPRKLINE
RLSLARANSVKALVNEYNVDASRLSTQGFQAWDQPIADNKTKEGRAMNRRVFATITGSRTVVVQPGQEAA
APAAAQ

>AHB89854.1 outer membrane protein ompK [Acinetobacter baumannii ZW85-1]
MQLKQLAATCALLSATAMVQAKPIWQDFSVTGLYGENYEYVDDKETTITILEYAAKVKYADVFFFMDRMRG
ENDHKSTYFELSPRLSLGEVSGKKLAYGPIKDVLISTTWESNSSENGNFDNFLYGFVAVDLDIPIYFYANL
NFYRANNENTDDDYQMTFVYGIPIFKIASEDFLVDGFLDWSTAEGDHASELNWTTQWKWNVGKHI SPDTRL
YLGIEHSVWNNKFLQGRDENNVSAKVYHF
```

#### *Escherichia Coli*

```
>AMY15336.1 OmpC, partial [Escherichia coli]
LSLLVPALLVAGAANAAYIYNKDGKLDLYGIVDGLHYFSDNDSKDGDETYMRLGFKGETQVTDQLTGYG
QWEYQIQNEPESDNSSWTRVAFAGLKFQDVGSFDYGRNYGVVYDVTSWTDVLPFEGGDTYDSDNFMQQR
GNGFYATYRNTDFDFGLVDGLDFAVQYQGKNGSAHGEGMTTNGRDDVFEQNGDGVGGSITYNYEGFGIGA
VSSSKRTWDQNNTGLIGTGDRAEYTGGLKYDANNIYLAAYQYQTYNATRVGSLGWANKAQNFEAVAQYQF
DFGLRPSLAYLQSKGKNLGRGYDDEDILKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDDNRFTRDAGINTDDI
VALGLVY

>CAD6017706.1 ompF [Escherichia coli]
MMKRNI LAVIVPALLIAGTANAAYIYNKDGKVDLYGKAVGLHYFSKNGENSYGGNGDMTYARLGFKGE
TQINSDLTGYGQWEYNFQGNNSGADAQTGNKTRLAFAAGLKYADVGSFDYGRNYGVVYDALGYTDMLPEF
GGDTAYSDDFFVGRVGGVATYRNSNFFGLVDGLNFAVQYLKNERDTARRSNGDGVGGSISYEYEGFGIV
GAYGAADRNLQEAQPLGNGKKAQWATGLKYDANNIYLAANYGETRNATPIITNKFTNTSGFANKTQDVL
LVAQYQFDFGLRPSIAYTKSKAKDVEGIGDVLVNYFEVGATYYFNKNMSTYVDYIINQIDSDNKLGVGS
DDTVAVGIVYQF

>CAD6022852.1 lamB [Escherichia coli]
MMITLRLKPLAVAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEGQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELK
LGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGNLIEWLPGSTIWAGKRFYQRHVDHMI
DFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAVTRSSEAGGSSSFASNNIYDYTNETANDVFDVRLAQMEINPGG
TLELGVVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGLWFTAHTQSVLKGFNKVVQYATDSMTSQGKGLSQGSGVAYV
DEKFSYDINNNGHMLRILDHGAISMGDNDMMYVGMVQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWTPI MSTLME
IGYDNVKSQRTGDTNNQYKITLAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKWKGYDYTDKAKGTPNYGKAVP
ANFEGGSFGRGDSDEWTFGAQMEIWW
```

#### *Salmonella Typhimurium*

```
>WP_000769039.1 MULTISPECIES: porin OmpD [Salmonella]
MKLKLVAVAVTSLLAAGVVNAAEVYNKDGKLDLYGKVHAQHYSDDNGSDGDKTYARLGFKGETQINDQ
LTGFGQWEYEFKGNRTESQGADKDKTRLAFAAGLKFADYGSFDYGRNYGVAYDIGAWTDVLPFEGGDTWTQ
TDVFMGTGRTTG VATYRNTDFDFGLVEGLNFAAQYQGNDRREGAYESNGDGFGLSATY EYEGFGVGAAYAKS
DRTNNQVKAASNLNAAGKNAEVWAAGLKYDANNIYLATTYSETLNM TTFGEDAAGDAFIANKTQNFEEVA
```

QYQFDFGLRPSIAYLKSCKGNLGTYGQDLVEYIDVGATYYFNKNMSTFVDYKINLLDDSDFTKAAKVST  
DNIVAVGLNYQF

>NP\_460252.1 MltA-interacting protein MipA [Salmonella enterica subsp.  
enterica serovar Typhimurium str. LT2]  
MTKLKLLALGVFIATSASVAHAESNLTLGAGVGVVEHPYKDYSDVYPIPVIAYESENFWFRGLGGGYLL  
WNDNADKLSIMAYWSPMYFKPGSDDDHQLRRLDRRKSTMMAGVSYAHHTQYGFRLRTSLAGDTLDNSNGIV  
WDLAWLYRYTNGGLTLTPGIGVEWNSQNDYQVSRKESRSGLRGYNPNDSWNPYLELSANYNFAGN  
WSVYGTARYTRLSDEITDSPMVDKSWTGILSTGVTYRF

>QGT88810.1 maltoporin LamB [Salmonella enterica subsp. enterica serovar  
Typhi]  
MMITLRLKPLAVAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEGQQCFQVTGAQSKYRLGNECETYAELK  
LGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVNQQNDWESTDPAFREANVQGNLIEWLPGSTIWAGKRFYQRHVDHMI  
DFYYWDISGPGAGIENIDLGFGLSLAATRSTEGAGSYTFSSQNIYDEVKDTANDVFDVRLAGLQTNPDG  
VLELGVVDYGRANTTDGYKLAGDASKDGMWFTAHTQSMLKGYNKFFVQYATDAMTTQGGKQARGSDGSSS  
FTEELPDGTKINYANKVINNNGDMWRILDHGAISLGDKDWLMYVGMQNIQNDWNNLGTTEWWTGVRPMPYK  
WTPIMSTLLEVGYNVKSQQTGDRNNQYKITLAQQWQAGDSIWSRPAIRIFATYAKWDEKWKGYIKDGDNI  
SRYAAATNSGISTNSRGDSDEWTFGAQMEIWW

>AAA86618.1 SipA [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium  
str. SL1344]  
MVTSVRTQPPVIMPGMQTEIKTQATNLAANLSAVRAKCHSDAVREIKGPQLEDFPALIKQASLDALFKCG  
KDAEALKEVFTNSNNVAGKKAIMEFAGLFRSALNATSDSPEAKTLLMKVGAEYAAQIIKDGLKEKSAFGP  
WLPETKKAEEKLENLEKQLLDIIKNNTGGELSCLKSTNLVMEVMPYIASCIEHNFCTLDPLTRSNLTHL  
VDKAAAKAVEALDMCPQKLTQEQGTSVGREARHLEMQTLIPLLLRNVAQIPADKLPDPKIPPEAAGPVP  
DGGKKAEPGTINININIDSSNHSVDNSKHINNAEPVDNGQRHIDNSNHDNSRKTIDNSRTFIDNSQRNGE  
SHHSTNSSNVSHSRVDSTTHQTETAHSASTGAIDHGIAGKIDVTAHATAEAVTNASSESKDGKVVSTSE  
KGTGTGETTSFDEVDGVTSKSIIIGKPVQATVHGVDDNKQSQTAIEIVNVKPLASQLAGVENVKTDTLQSDT  
TVITGNKAGTTDNDNSQTDKTPGPFSGLKFKQNSFLSTVPSVTNMHSMHFDARETFLGVIRKALEPDTSTP  
FPVRRAFDGLRAEILPNDTIKSAALKAQCSIDIKHPELKAKMETLKEVITHHPQKEKLAELALQFAREAG  
LTRLKGETDYVLSNVLDGLIGDGSWRAGPAYESYLNKPGVDRVITTVDGLHMQR

>AIH09359.1 OmpA, partial [Salmonella enterica subsp. enterica serovar  
Typhimurium]  
MKRTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNTWYAGAKLGSQYHDTGFIHNDGPTHENQLGAGAFGGYQVNPYV  
GFEMGYDWLGRMPYKGDNINGAYKAQGVQLTAKLGYPIITDDLVDVYTRLGGMVWRADTKSNVPGGPSTKDH  
DTGVSPVFAGGIEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDANTIGTRPDNGLLSVGVSYRFGQOEAAAPVVAPAPAP  
APEVQTKHFTLKSVDLNFNFKSTLKPEGQALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGFTDRIGSDAYNQGLSEK  
RAQSVVDYLIISKGIPSDKISARGMGESNPVTGNTCDNVKPRAALIDCLAPDRRVEIEVKGVKDVVTQPQA

>AIH09857.1 OmpC, partial [Salmonella enterica subsp. enterica serovar  
Typhimurium]  
MKVKVLSLLVPALLVAGAANAEEIYNKDGKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDDGQTYMRIGFKGETQVNDQ  
LTGYGQWEYQIQGNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYGRNYGVTYDVTSWTDVLPFEGGDTYGADN  
FMQQRNGYATYRNTDFFGLVDGLDFALQYQKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGSLTYAIGEGFSVG  
GAIITTSKRATDQNNANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAQAQSYQTYNATRFGTSNGSNPSTSYGF  
ANKAQNFVVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDISNGYGASYGDQDIVKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKI  
NLLDKNDFTRDAGINTDDIVELGLVYQF

### *Neisseria Meningitidis*

>BCT10438.1 oligopeptidase A [Neisseria meningitidis]  
MTDNALLHLGEEPRFDQIKTEDIKPALQTAIAEAREQIAAIIKAQTHTGWANTVEPLTGWANTVEPLTGIT  
ERVGRIWGVVSHLNSVTDTPELRAVYNELMPEITVFFTEIGQDIELYNRFKTIKNSPEFDTLSPAQKTKL

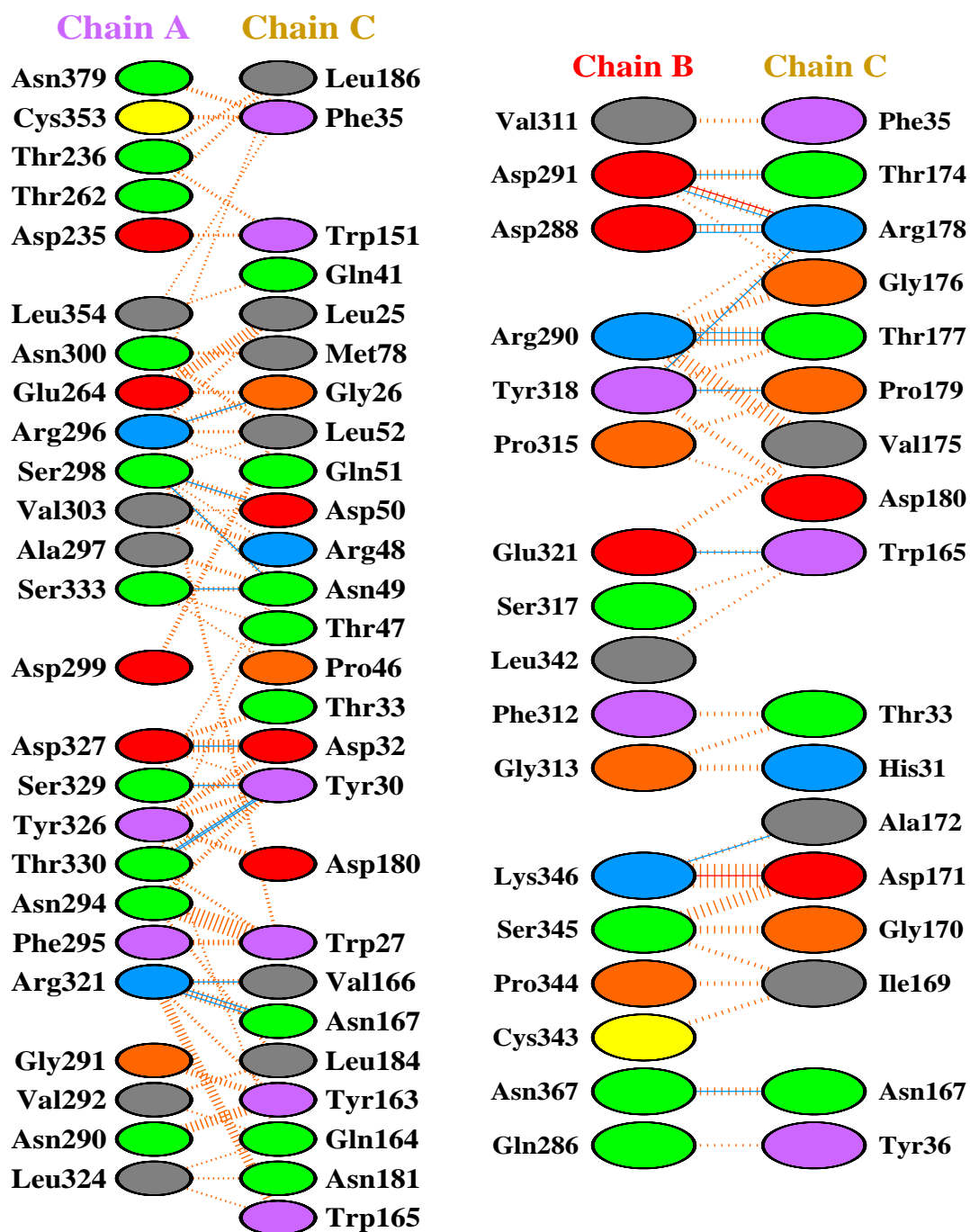
NHDLRDFVLSGAELPPEQQAELAKLQTEGAQLSAKFSQNVLDATDAFALYFDDAAPLAGIPKDALAMFAA  
AAQSEGKTGYKIGLQIPHYLAVIQYADNRELREQIYRAYVTRASELSDGGKFDNTANIDRTLANALQTAK  
LLGFKNYAELSLATKMADTPEQVLNFLHDLACRAKPYAEKDLAEVKAFARERLNLADPQPWDLGYAGEKL  
REAKYAFSETEVKKYFPVSKVLAGLFAQIKKLYGIGFTEKTVPIWHKDVRYFELQQNGETIGGVYMDLYA  
REGKRGGAWMNDYKGRRRFADGTLQLPTAYLVCNFTPPVGGKEARLSHDEILTLFHETGHGLHLLTQVD  
ELGVSGINGVEWDAVELPSQFMENFVWEYNVLAQMSAHEETGVPLPKELFDKMLAAKNFQRGMFLVRQME  
FALFDMMIYSEDDEGRLKNWQQVLDVSRKKVAVIQPPEYNRFALSFGHIFAGGYSAGYYSYAWAEVLSAD  
AYAAFEESDDVAATGKRFWQEILAVGGSRSAAESFKAFRGREPSIDALLRHSGFDNAA

>AAC17599.1 outer membrane protein Omp85 [Neisseria meningitidis]  
MKLKQIASALMMLGISPLAFADFTIQDIRVEGLRTEPSTVFNYLPVKVGDYNDTHGSAI IKSLEYATGF  
FDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQSQYFNQATLNQAVAGLKEEY  
LGRGKLNQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIEFEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRS  
NQFNEQKFAQDMEKVTDIFYQNNGYFDFRILDITDIQTNEKDTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVP  
KAELEKLLTMKPGKWERQOMTAVLGEIQNRMGSAQYAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVN  
EIHITGNNKTRDEVVRRELQMESAPYDTSKLQRSKERVELLGYFDNVQFDVAVPLAGTPDKVDLNMSLTE  
RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGLSFTDPYFTADGVSLGYDVY  
GKAFFPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNTYNKAPKHYADFIKKYGKTDG  
TDGSFKGWLYKGTWGWGRNKTDLSALWPTRGYLTGVNAEIALPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLG  
GEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSVRGYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGA  
KDARTVRLSLFADAGSVWDGKTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPM  
KFRYAYPLKKKPEDEIQRFQFLGTTF

>AKM12323.1 MafA [Neisseria meningitidis]  
MKILLLLIPLVLTACGTLTGIPAHGGGRFAVEQELVAASSRAAVKEMDLSALKGRKAALYVSVMGDQGS  
GNISGGRYSIDALIRGGYHNNPESATQYSYPAYDTTATTKSDALSSVTTSTSLLNAPAAALTRNSGRKGE  
RSAGLSVNGTGDYRNETLLANPRDVSFLTNIQTVFYLRGIEVVPPEYADTDVFTVDVFGTVRSRTELH  
LYNAETLKAQTKLEYFAVDRDSRKLIIAPETAAYESQYQEYALWMPYSVGKTVKASDRMLMVDSDITP  
YGDTTAQNRPDFKQNNNGKNPDVGNVIRRRKGG

## Interacciones en PDMsum

### OmpA model 1





## Tablas de los epítomos para células B

### OmpA

Rank	Secuencia	Posición	Score
1	ASTGVSRSEHDTGVSP	137	0.94
2	HDTGFYGNQFNNGP	40	0.93
2	TRDIATRLEYQWVNNI	163	0.93
3	RGMGESNPVTGNTCDN	308	0.9
4	GGMVWRADSKGNYAST	124	0.89
5	HFTLKSDVLFNFNKAT	224	0.88
6	LGWSQYHDTGFYGNQF	34	0.87
7	GDAGTVGTRPDNGMLS	179	0.86
8	FEMGYDWLGRMAYKGS	77	0.85
8	TAKLGYPTDDLDIYT	106	0.85
9	GSEAYNQQLSEKRAQS	275	0.83
10	PVTGNTCDNVKARAAL	315	0.82
10	DNTWYAGGKLGWSQYH	25	0.82
11	AGGVEWAVTRDIATRL	155	0.81
12	LGRMAYKGSVDNGAFK	84	0.79
13	NDQLGAGAFGGYQVNP	58	0.78
-13	RVEIEVKGYKEVVTQP	339	0.78
13	PVVAPAPAPEVATK	208	0.78
14	QLSNMDPKDGSVVLG	254	0.77
14	NGMLSLGVSYRFGQED	190	0.77
14	HDTGVSPVFAGGVEWA	146	0.77
15	GGYQVNPYLGEMGYD	67	0.76
15	AKGIPAGKISARGMGE	297	0.76
16	AVVLGYTDRIGSEAYN	265	0.75
16	AGFATVAQAVPKDNTW	13	0.75
17	LSEKRAQSVVDYLVAK	283	0.73
17	GQEDAAPVVAPAPAPA	202	0.73
18	GFQNNNGPTRNDQLGA	48	0.71

18	RAALIDCLAPDRRVEI	327	0.71
18	PAPEVATKHFTLKSDV	216	0.71
19	AIAIAVALAGFATVAQ	5	0.67
20	SVDNGAFKAQGVQLTA	92	0.63

### OmpC:

Rank	Sequence	Start position	Score
1	PEFGGDTYGSDNFLQS	134	0.95
2	NFEVVAQYQDFGLRP	281	0.93
3	DVTSWTDVLPEFGGDT	125	0.92
4	QLTGYGQWEYNVQANN	74	0.91
5	YVDVGATYYFNKNMST	320	0.9
5	LQSKGKDLERGYGDQD	301	0.9
6	AGAANA AEIYNKDGNK	20	0.89
7	GETQINDQLTGYGQWE	67	0.84
7	DGDQTYMRVGVKGETQ	55	0.84
7	SGEGATNNGRGWSKQN	183	0.84
8	NATRAGSLGFANKAQN	266	0.83
8	AETYTGGLKYDANNIY	241	0.83
9	DGISAGFAYSHSKRTD	212	0.82
9	NGVATYRNSDFFGLVD	152	0.82
9	GLKFGDAGSFDYGRNY	105	0.82
10	YGDQDILKYVDVGATY	312	0.81
10	LGRGDNAETYTGGLKY	235	0.81
10	GWSKQNGDGFGLTSLTY	193	0.81
11	YLASQYTQTYNATRAG	256	0.8
11	AGSFDYGRNYGVVYDV	111	0.8
12	AGISTDDVVALGLVYQ	353	0.79
13	GDGFGTSLTYDIWDGI	199	0.78
14	DLYGKIDGLHYFSDDK	37	0.76
14	GLKYDANNIYLASQYT	247	0.76

15	NLLDDNSFTRNAGIST	342	0.73
15	NYGVVYDVTSWTDVLP	119	0.73
16	TRLAFAGLKFGDAGSF	99	0.72
17	TDEQNSVPALGRGDNA	226	0.71
17	QYQGKNGSVSGEGATN	174	0.71
18	ESSSDQAWTRLAFAGL	91	0.7
19	MRVGVKGETQINDQLT	61	0.69
20	GLRPSVAYLQSKGKDL	293	0.68
20	DGLNFALQYQGKNGSV	167	0.68
21	EYNVQANNTESSSDQA	82	0.67
21	GLHYFSDDKSVDGDQT	44	0.67
22	EIYNKDGKLDLYGKI	27	0.65
23	YVDYKINLLDDNSFTR	336	0.64

## Tablas de epítomos para células T

### OmpA. EPITOPOS PARA MHC CLASE I:

allele	start	end	length	peptide	score	rank
HLA-A*01:01	60	69	10	YTDRIGSEAY	0.995839	0.01
HLA-B*27:02	58	67	10	RRVEIEVKGY	0.974378	0.01
HLA-B*07:02	47	55	9	RPDNGMSLS	0.961338	0.03
HLA-B*35:01	41	50	10	YPITDDLDIY	0.951812	0.02
HLA-B*27:02	6	14	9	KRAQSVVDY	0.924032	0.05
HLA-A*68:01	10	18	9	SVVDYLVAK	0.903229	0.07
HLA-B*15:01	37	45	9	SQYHDTGFY	0.883889	0.03
HLA-A*01:01	59	69	11	GYTDRIGSEAY	0.879895	0.04
HLA-B*15:01	51	59	9	GMSLSGVSY	0.876982	0.03
HLA-A*68:01	9	18	10	EVATKHFTLK	0.870481	0.12
HLA-A*68:01	39	47	9	NTCDNVKAR	0.870358	0.12
HLA-B*08:01	9	17	9	EVATKHFTL	0.867843	0.02
HLA-A*02:01	37	45	9	ALDQLYTQL	0.855682	0.06
HLA-B*15:01	34	42	9	GQQALDQLY	0.84448	0.05
HLA-A*01:01	43	50	8	ITDDLDIY	0.843837	0.05
HLA-B*08:01	43	50	8	NVKARAAL	0.842785	0.03
HLA-B*44:02	4	14	11	SEHDTGVSPVF	0.840318	0.04
HLA-B*18:01	60	67	8	VEIEVKGY	0.838007	0.04

HLA-B*15:01	33	41	9	VQLTAKLGY	0.835042	0.05
HLA-A*03:01	10	18	9	SVVDYLVAK	0.818004	0.07
HLA-B*39:01	5	13	9	EHDTGVSPV	0.8027	0.04
HLA-A*03:01	21	31	11	VLNFNKATLK	0.792621	0.09
HLA-B*40:01	4	14	11	SEHDTGVSPVF	0.792562	0.11

**EPITOPOS PARA MHC CLASE II**  
**DPA1/DPB1 – DQA1/DQB1**

allele	start	end	length	peptide	rank
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	1	15	15	MKKTAIAlAVALAGF	0.06
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	2	16	15	KKTAIAIAVALAGFA	0.41
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	9	23	15	AVALAGFATVAQAVP	0.89
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	10	24	15	VALAGFATVAQAVPK	0.89
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	8	22	15	IAVALAGFATVAQAV	0.91
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	7	21	15	AlAVALAGFATVAQA	1.1
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	8	22	15	IAVALAGFATVAQAV	1.1
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	11	25	15	ALAGFATVAQAVPKD	1.2
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	95	109	15	NGAFKAQGVQLTAKL	1.3
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	9	23	15	AVALAGFATVAQAVP	1.4
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	96	110	15	GAFKAQGVQLTAKLG	1.5
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	6	20	15	IAIAVALAGFATVAQ	1.5
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	9	23	15	AVALAGFATVAQAVP	1.6
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	149	163	15	GVSPVFAGGVEWAVT	1.6
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	10	24	15	VALAGFATVAQAVPK	1.6
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	150	164	15	VSPVFAGGVEWAVTR	1.6
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	151	165	15	SPVFAGGVEWAVTRD	1.7
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	7	21	15	AlAVALAGFATVAQA	1.8
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	201	215	15	FGQEDAAPVVAPAPA	1.8
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	8	22	15	IAVALAGFATVAQAV	1.8
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	148	162	15	TGVSPVFAGGVEWAV	1.8
HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	1	15	15	MKKTAIAlAVALAGF	1.9
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	5	19	15	AlAlAVALAGFATVA	2
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	7	21	15	AlAVALAGFATVAQA	2

**DRB1**

allele	start	end	length	peptide	rank
HLA-DRB1*16:02	291	305	15	VVDYLVAKGIPAGKI	0.19
HLA-DRB1*16:02	292	306	15	VDYLVAKGIPAGKIS	0.27
HLA-DRB1*16:02	290	304	15	SVVDYLVAKGIPAGK	0.28

HLA-DRB1*10:01	291	305	15	VVDYLVAKGIPAGKI	0.34
HLA-DRB1*10:01	292	306	15	VDYLVAKGIPAGKIS	0.44
HLA-DRB1*10:01	290	304	15	SVVDYLVAKGIPAGK	0.5
HLA-DRB1*16:02	289	303	15	QSVVDYLVAKGIPAG	0.52
HLA-DRB1*16:01	291	305	15	VVDYLVAKGIPAGKI	0.76
HLA-DRB1*16:02	293	307	15	DYLVAKGIPAGKISA	0.83
HLA-DRB1*10:01	289	303	15	QSVVDYLVAKGIPAG	0.84
HLA-DRB1*10:01	95	109	15	NGAFKAQGVQLTAKL	0.9
HLA-DRB1*03:01	159	173	15	EWAVTRDIATRLEYQ	0.95
HLA-DRB1*03:01	158	172	15	VEWAVTRDIATRLEY	0.97
HLA-DRB1*10:01	293	307	15	DYLVAKGIPAGKISA	1.1
HLA-DRB1*16:01	290	304	15	SVVDYLVAKGIPAGK	1.1
HLA-DRB1*16:02	288	302	15	AQSVVDYLVAKGIPA	1.2
HLA-DRB1*16:01	292	306	15	VDYLVAKGIPAGKIS	1.2
HLA-DRB1*03:01	160	174	15	WAVTRDIATRLEYQW	1.2
HLA-DRB1*10:01	96	110	15	GAFKAQGVQLTAKLG	1.3
HLA-DRB1*10:01	94	108	15	DNGAFKAQGVQLTAK	1.4
HLA-DRB1*04:07	291	305	15	VVDYLVAKGIPAGKI	1.4
HLA-DRB1*03:01	157	171	15	GVEWAVTRDIATRLE	1.7
HLA-DRB1*10:01	288	302	15	AQSVVDYLVAKGIPA	1.9
HLA-DRB1*04:07	290	304	15	SVVDYLVAKGIPAGK	1.9

### OmpC. EPITOPOS PARA MHC CLASE I

allele	start	end	length	peptide	score	rank
HLA-A*01:01	40	48	9	YVDVGATYY	0.991139	0.01
HLA-A*01:01	6	17	12	STDDVVALGLVY	0.988483	0.01
HLA-B*35:01	47	55	9	LASQYTQTY	0.976485	0.01
HLA-A*01:01	48	60	13	FSDDKSVDGDQTY	0.974261	0.01
HLA-C*03:02	47	55	9	LASQYTQTY	0.97164	0.01
HLA-B*44:02	20	28	9	TESSSDQAW	0.970905	0.01
HLA-A*24:02	39	49	11	KYVDVGATYYF	0.959559	0.01
HLA-B*18:01	17	25	9	DEQNSVPAL	0.95077	0.02
HLA-A*01:01	32	40	9	YGDQDILKY	0.948891	0.02
HLA-A*24:02	38	48	11	LYGKIDGLHYF	0.940351	0.01
HLA-B*27:02	9	17	9	SRANGVATY	0.939034	0.04
HLA-A*31:01	10	18	9	RANGVATYR	0.929326	0.01
HLA-B*27:02	29	38	10	TRLAFAGLKF	0.928184	0.04
HLA-B*18:01	2	10	9	FEVVAQYQF	0.92714	0.02
HLA-C*04:01	39	47	9	KYDANNIYL	0.918242	0.01

HLA-B*44:02	31	40	10	AETYTGGLKY	0.917144	0.02
HLA-A*68:01	22	30	9	SSSDQAWTR	0.907167	0.07
HLA-B*15:01	8	20	13	YQDFGLRPSVAY	0.900795	0.02
HLA-A*24:02	58	66	9	SWTDVLPEF	0.893599	0.03
HLA-B*15:01	37	47	11	ILKYVDVGATY	0.892954	0.03
HLA-A*68:01	21	30	10	ESSSDQAWTR	0.890107	0.08
HLA-B*27:02	17	25	9	YRNSDFFGL	0.883377	0.07
HLA-A*01:01	32	40	9	ETYTGGLKY	0.881313	0.04
HLA-A*68:01	51	59	9	YTQTYNATR	0.87742	0.11

**EPITOPOS PARA MHC CLASE II  
DPA1/DPB1 – DQA1/DQB1**

allele	start	end	length	peptide	rank
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	16	30	15	ALLVAGAANA AEIYN	0.21
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	15	29	15	PALLVAGAANA EIY	0.21
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	14	28	15	VPALLVAGAANA EI	0.21
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	13	27	15	LVPALLVAGAANA E	0.27
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	17	31	15	LLVAGAANA AEIYNK	0.58
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	12	26	15	LLVPALLVAGAANA	0.69
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	18	32	15	LVAGAANA AEIYNKD	0.94
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	3	17	15	IRTFKVL SLLVPAL	0.96
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	4	18	15	RTFLKVL SLLVPALL	1.1
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	2	16	15	LIRTFKVL SLLVPA	1.2
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	14	28	15	VPALLVAGAANA EI	1.4
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	15	29	15	PALLVAGAANA EIY	1.5
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	6	20	15	FLKVL SLLVPALLVA	1.6
HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	3	17	15	IRTFKVL SLLVPAL	1.6
HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	2	16	15	LIRTFKVL SLLVPA	1.6
HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	1	15	15	MLIRTFKVL SLLVP	1.6
HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	4	18	15	RTFLKVL SLLVPALL	1.6
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	5	19	15	TFLKVL SLLVPALLV	1.6
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	16	30	15	ALLVAGAANA AEIYN	1.7
HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	13	27	15	LVPALLVAGAANA E	1.7
HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	27	41	15	AWTRLA FAGLKFGDA	1.8
HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	1	15	15	MLIRTFKVL SLLVP	1.9
HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	7	21	15	LKVL SLLVPALLVAG	2
HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	1	15	15	MLIRTFKVL SLLVP	2

**DRB1**

allele	start	end	length	peptide	rank
HLA-DRB1*01:01	3	17	15	IRTKVLSLLVPAL	0.01
HLA-DRB1*01:01	4	18	15	RTFLKVLSPALL	0.01
HLA-DRB1*01:01	6	20	15	FLKVLSPALLVA	0.1
HLA-DRB1*01:01	5	19	15	TFLKVLSPALLV	0.1
HLA-DRB1*01:01	7	21	15	LKVLSPALLVAG	0.16
HLA-DRB1*07:01	1	15	15	YGSDNFLQSRANGVA	0.19
HLA-DRB1*14:02	45	59	15	ATYYFNKNMSTYVDY	0.22
HLA-DRB1*14:02	46	60	15	TYYFNKNMSTYVDYK	0.22
HLA-DRB1*01:01	8	22	15	KVLSLLVPALLVAGA	0.24
HLA-DRB1*07:01	2	16	15	GSDNFLQSRANGVAT	0.27
HLA-DRB1*07:01	3	17	15	SDNFLQSRANGVATY	0.27
HLA-DRB1*14:02	44	58	15	GATYYFNKNMSTYVD	0.28
HLA-DRB1*07:01	4	18	15	DNFLQSRANGVATYR	0.35
HLA-DRB1*16:02	3	17	15	SDNFLQSRANGVATY	0.36
HLA-DRB1*14:02	35	49	15	TGGLKYDANNIYLAS	0.38
HLA-DRB1*14:02	43	57	15	VGATYYFNKNMSTYV	0.38
HLA-DRB1*14:02	47	61	15	YYFNKNMSTYVDYKI	0.4
HLA-DRB1*14:02	36	50	15	GGLKYDANNIYLASQ	0.44
HLA-DRB1*13:01	3	17	15	IRTKVLSLLVPAL	0.46
HLA-DRB1*13:01	2	16	15	LIRTKVLSLLVPA	0.46
HLA-DRB1*13:01	1	15	15	MLIRTKVLSLLVP	0.46
HLA-DRB1*14:02	34	48	15	YTGGLKYDANNIYLA	0.53
HLA-DRB1*16:02	4	18	15	DNFLQSRANGVATYR	0.57
HLA-DRB1*07:01	2	16	15	DGISAGFAYSHSKRT	0.64