

UNIVERSIDAD DE INVESTIGACIÓN DE TECNOLOGÍA EXPERIMENTAL YACHAY

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E INGENIERÍA

Producción recombinante de una vacuna contra *Salmonella* spp.
mediante microalgas

Trabajo de titulación presentado como requisito para la
obtención del título de Magíster en Biología Sintética

Autor:

Mora Ochoa Yuliana Isabel

Tutor:

Ph.D, Ramírez Cando Lenin Javier

Urcuquí, Agosto 2024

AUTORÍA

Yo, **YULIANA ISABEL MORA OCHOA**, con cédula de identidad 0706742453, declaro que las ideas, juicios, valoraciones, interpretaciones, consultas bibliográficas, definiciones y conceptualizaciones expuestas en el presente trabajo; así cómo, los procedimientos y herramientas utilizadas en la investigación, son de absoluta responsabilidad del autor del trabajo de titulación.

Así mismo, me acojo a la normativa interna de la Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay.

San Miguel de Urucuquí, Agosto 2024

Yuliana Isabel Mora Ochoa

CI: 0706742483

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **YULIANA ISABEL MORA OCHOA**, con cédula de identidad 0706742483, cedo a la Universidad de Tecnología Experimental Yachay, los derechos de publicación de la presente obra, sin que deba haber un reconocimiento económico por este concepto. Declaro además que el texto del presente trabajo de titulación no podrá ser cedido a ninguna empresa editorial para su publicación u otros fines, sin contar previamente con la autorización escrita de la Universidad.

Asimismo, autorizo a la Universidad que realice la digitalización y publicación de este trabajo de titulación en el repositorio virtual, de conformidad a lo que dispone la Ley Orgánica de Educación Superior

San Miguel de Urququí, Agosto 2024

Yuliana Isabel Mora Ochoa

CI: 0706742483

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis amados padres, Patricio y Maribel. Este trabajo es testimonio de su amor incondicional y apoyo constante. Su fe en mis capacidades incluso cuando yo no lo hacía, ha sido la luz y el motor para este logro.

Yuliana Isabel Mora Ochoa

Agradecimiento

Agradezco a mi familia por su amor incondicional, apoyo y aliento en los momentos de estrés y desánimo. Su seguridad en mi capacidad para superar los desafíos fue lo que me mantuvo adelante.

Agradezco a mis amigos por su sinceridad, su honestidad, colaboración intelectual y moral, por crear un ambiente agradable y estimulante, y por los buenos momentos.

Agradezco a mi asesor de tesis, cuya experiencia, comprensión y paciencia, me guiaron durante el proceso de investigación y escritura. Su mentoría fue invaluable y motivadora.

Finalmente, agradezco a mis profesores de maestría por su sabiduría, enseñanzas y el ambiente académico ameno. A la Senecyt por proporcionar los recursos necesarios para cursar la maestría.

Yuliana Isabel Mora Ochoa

Índice

Introducción -----	3
Justificación -----	6
Objetivos -----	8
Objetivo General -----	8
Objetivos específicos -----	8
Hipótesis o pregunta de investigación -----	8
Materiales y métodos-----	9
Selección de la proteína fimH en Salmonella typhimurium-----	9
Predicción de epítomos CTL y HTL -----	9
Construcción de la vacuna multiepítomo -----	11
Diseño de la secuencia -----	11
Estructura, predicción y validación -----	11
Análisis de la vacuna multiepítomo -----	12
Predicción de los epítomos de células B -----	12
Dinámica molecular de la vacuna -----	13
Simulación inmunológica de la vacuna -----	14
Optimización de codón y clonación -----	14
Resultados -----	15
Selección de la proteína fimH y prueba de antigenicidad -----	15
Predicción de epítomos CTL y HTL -----	15
Construcción de la vacuna multiepítomo -----	20
Estructura, predicción, validación de la vacuna multiepítomo-----	21
Análisis de la vacuna multiepítomo -----	24
Predicción de células B -----	25
Dinámica molecular de la vacuna multiepítomo -----	29
Simulación inmunológica -----	30

Optimización y clonación -----	35
Discusión -----	38
Conclusión -----	42
Recomendaciones -----	42
Referencias -----	43
Anexos -----	55

Índice de tablas

Tabla 1: Predicción de 2 epítomos CTL mediante NetCTL 1.2, AlgPred, Vaxijen v4.0, ToxinPred y Class I Immunogenicity. -----	16
Tabla 2: Predicción de HTL mediante IEDB MHC-II, AlgPred, Vaxijen, ToxinPred e IFN-Epitope.-----	17
Tabla 3: Epítomos HTL finales sin superponerse, que se usaran para el diseño de la vacuna. -----	19
Tabla 4: Resultados de los parámetros de calidad de los constructos 1 y 2, obtenidos del servidor Expsy-ProtParam -----	25
Tabla 5: Predicción de epítomos de células B lineales y discontinuas del constructo 1 y constructo 2. -----	26

Índice de gráficos

Figura 1: Estructura 3D de la proteína fimH. -----	15
Figura 2: Estructura 3D del constructo 1. -----	21
Figura 3: Estructura 3D del constructo 2. -----	21
Figura 4: Análisis de la vacuna multiepítopo.-----	22
Figura 5: Análisis de calidad de la vacuna multiepítopo. -----	23
Figura 6: Diagrama de Ramachandran. -----	24
Figura 7: Estructura cristalina del complejo TLR 4 – humano (Accession number PDB: 3FXI_1).-----	29
Figura 8: Interacción de la dinámica molecular entre TLR 4 con el constructo 1 (A) y con el constructo 2 (B).-----	30
Figura 9: Simulación inmunológica. -----	33
Figura 10: Clonación in silico. -----	37

Resumen

Varios miembros del género *Salmonella* son conocidos como agentes patógenos causantes de salmonelosis, una de las principales enfermedades zoonóticas a nivel mundial. La salmonelosis se transmite por el consumo de alimentos contaminados y se presenta tanto en animales como en humanos. El uso constante de antibióticos ha generado bacterias multirresistentes, dificultando su tratamiento y ocasionando pérdidas económicas en el sector avícola y en salud pública. Las vacunas multiepítomos, empleando microalgas como vía de administración, representan un medio viable y accesible para el control de nuevos casos de *Salmonella*. La proteína *fimH* presente en *Salmonella typhimurium*, comprende la base para la vacuna. Partiendo desde el diseño de epítomos, hasta su clonación y expresión en *Chlorella vulgaris* mediante herramientas inmunoinformáticas y bioinformáticas. Se obtuvieron dos diseños de vacunas. Las simulaciones inmunológicas de ambos diseños generan un incremento de inmunoglobulinas y de células B, es decir, una respuesta inmune. A su vez, ambos constructos son capaces de ser expresados en microalgas. Por lo tanto, se concluye que el diseño de una vacuna multiepítomo representa una alternativa al uso de antibióticos, mucho más accesible y con una respuesta inmune prolongada. Junto a su expresión en microalgas, facilitara su producción y administración en pollos de engorde.

Palabras Clave:

Salmonella typhimurium, *Chlorella vulgaris*, Inmunoinformática, vacuna multiepítomo.

Abstract

Several members of the genus *Salmonella* are known as pathogenic agents causing salmonellosis, one of the main zoonotic diseases worldwide. Salmonellosis is transmitted through the consumption of contaminated food and occurs in both animals and humans. The constant use of antibiotics has generated multi-resistant bacteria, complicating their treatment and causing economic losses in the poultry sector and public health. Multi-epitope vaccines, using microalgae as a route of administration, represent a viable and accessible means for the control of new cases of *Salmonella*. The *fimH* protein present in *Salmonella typhimurium* serves as the basis for the vaccine. Starting from epitope design to cloning and expression in *Chlorella vulgaris* using immunoinformatics and bioinformatics tools, two vaccine designs were obtained. Immunological simulations for both designs generate an increase in immunoglobulins and B cells, that is, an immune response. In turn, both constructs can be expressed in microalgae. Therefore, it is concluded that designing a multi-epitope vaccine provides an alternative to antibiotic use, with greater accessibility and a prolonged immune response. Together with its expression in microalgae, it will facilitate its production and administration in broiler chickens.

Key Words:

Salmonella typhimurium, *Chlorella vulgaris*, Immunoinformatic, Multi-epitope vaccine.

Introducción

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica provocando infecciones gastrointestinales. Tiene una alta incidencia de casos a nivel mundial, tan solo en el 2019 se registraron 594 000 casos de los cuales el 79 000 resultaron en muertes (World Health Organization, 2024). Esta infección, usualmente, es transmitida por el consumo de alimentos contaminados, principalmente por carne de diferentes aves, y en menor medida mediante la ingesta de agua o el contacto con animales asintomáticos (Popa & Popa, 2021) convirtiéndose en un problema de salud pública mundial. Organizaciones como la OMS han fomentado la implementación de medidas de prevención y control (Antunes et al., 2015; Wessels et al., 2021). El agente patógeno causante de la salmonelosis pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram-negativo del género *Salmonella*. Este género se divide en dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. Acorde a la clasificación dada por Kauffman-White, existen alrededor de 2 500 serovares, móviles o inmóviles, que se agrupan según sus antígenos somáticos (O), capsulares (Vi) y flagelares (H). Las salmonelas tienen su reservorio natural en el intestino de humanos y animales (Figueroa Ochoa & Verdugo Rodríguez, 2005; Popa & Popa, 2021; Wessels et al., 2021).

En aves, la principal vía de contagio de salmonelosis es mediante transmisión vertical, es decir, de los padres a su progenie, a través de una infección transovárica o por contaminación la cloaca a los órganos reproductivos (Jajere, 2019). La sintomatología en aves maduras y recién nacidos varía, debido al potencial de virulencia del patógeno al momento de colonizar el tracto intestinal. Comúnmente se presentan signos tales como anorexia, depresión, plumas erizadas, acurrucamiento en grupos, somnolencia, deshidratación, diarrea blanca y reticencia a moverse (Nair & Kollanoor Johny, 2019). Se estima que la prevalencia de salmonelosis en los pollos de engorde se encuentra entre los 11 a 20 días, y en gallinas ponedoras de ≥ 45 días de edad (Rani et al., 2022). Sin embargo, se ha reportado en otros casos, que en pollos de una semana de edad presentan una alta tasa de mortalidad, mientras que los pollos mayores experimentan un déficit de crecimiento (El-Sharkawy et al., 2017). La presencia de diversos serovares de *Salmonella* en las granjas, se ha asociado con controles de bioseguridad deficientes en varios niveles de la línea de producción. Bajos niveles de *Salmonella* se atribuyen a la implementación de tecnologías o a la modificación de nutrientes en los piensos

alimenticios para las aves, como aditivos, antibióticos, prebióticos y probióticos que modifican la flora intestinal (Akil & Ahmad, 2019).

El uso imprudente de antibióticos y la cercanía de las granjas avícolas a las zonas residenciales y a los afluentes fluviales (Ramírez Cando et al., 2019), ha fortalecido la presencia de patógenos bacterianos resistentes (Mridha et al., 2020). Se ha registrado resistencia a varios antibióticos como las fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación, la amoxicilina, el ácido nalidíxico, ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, norfloxacina, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol y ceftazidima, por parte de *Salmonella* (Jajere, 2019; Phongaran et al., 2019; Popa & Popa, 2021). Los pacientes con enfermedades diarreicas han mostrado resistencia a los antibióticos dificultando los tratamientos, prolongando las hospitalizaciones y, en ocasiones, provocando la muerte (Parisi et al., 2018). Esta situación ha generado repercusiones económicas y un gran impacto en el área de la salud pública a nivel global (Djeffal et al., 2018; Phongaran et al., 2019).

En el trabajo de Popa & Popa (2021), recopila la presencia de brotes de *Salmonella* spp. desde 2015 hasta 2020. Países como Canadá, Australia, EE. UU, Japón, Brasil, África subsahariana, Israel, Chile y países de la Unión Europea, han identificado un mínimo de 24 hasta más de 1 000 pacientes, principalmente niños y ancianos, con síntomas de fiebre, vómito y diarrea asociada a salmonelosis. Todos estos casos se han vinculado con la ingesta de productos de pollo y pavo empanizados crudos congelados, brotes crudos de frijol, melón, pepino, carne molida, huevos, tahini, sushi y verduras frescas. Se identificaron diferentes serovares tales como *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* Thompson, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Concord y *Salmonella* Virchow. A principios de 2024 se han asociado productos de consumo masivo con *Salmonella* en EE. UU (Global Food Safety International, 2024). Por otro lado, el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos de la Unión Europea (RASFF) ha detectado productos de pollo contaminados con *Salmonella enterica* serotipo *Infantis*, procedente de España (Martínez, 2024). En ambas situaciones, procedieron con el retiro de los productos del mercado.

En humanos y animales, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* o salmonela tifoidea, es el principal causante de salmonelosis (Zafar et al., 2022). La vasta cantidad de alimentos que son fuentes de crecimiento de salmonela, ha facilitado un enlace epidemiológico entre la salmonelosis y los productos avícolas. Esto se debe a los diversos serotipos que se

superponen entre humanos y la carne de aves de corral (Antunes et al., 2015). Los serotipos *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella typhimurium* son los de mayor relevancia. Sin embargo, nuevos serotipos como *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Javiana, *Salmonella* Infantis y *Salmonella* Thompson se han aislado de casos de salmonelosis en humanos y aves de corral (Castro-Vargas et al., 2020).

El principal tratamiento para la salmonelosis es el uso de antibióticos. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos ha aumentado significativamente en *Salmonella* spp. dando lugar a la presencia de salmonelas multirresistentes. Esto ha dificultado el control de los brotes en la producción avícola (Velhner et al., 2018), clasificando el nivel de amenaza de la salmonela resistente a los medicamentos como “grave” (Bearson, 2022). Por ello, el uso de vacunas se presenta como una alternativa a los antibióticos. Algunas vacunas comerciales presentan desventajas, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas capaces de solventar estos problemas. Las vacunas vivas presentan cepas que pueden recuperar su virulencia, propagándose nuevamente al ser excretadas. Por otro lado, las vacunas inactivadas, suelen generar daño tisular ya que se administran vía intramuscular, requiriendo costos adicionales (K. Acevedo-Villanueva et al., 2021). Estos problemas presentes en las vacunas convencionales han motivado el diseño e implementación de varias vacunas contra *Salmonella*. Un diseño basado en las vesículas de membrana externa, conocido como Módulos Generalizados para Antígenos de Membrana (GMMA) mediante vía intranasal y subcutánea, ha sido probada en ratones con resultados aceptables, y se encuentra en proceso para ser implementada en voluntarios humanos (Baliban et al., 2020). La vacuna recombinante atenuada de *Salmonella* (RASV) es otro tipo de vacuna, la cual se ha utilizado en conjunto con prebióticos y probióticos (Clark-Curtiss & Curtiss, 2018; Redweik et al., 2020). Las vacunas se caracterizan por generar una respuesta inmune a largo plazo contra las infecciones (Gunasekaran & Gothandam, 2020; J. Li et al., 2021), reduciendo la necesidad del uso de antibióticos al prevenir la infección por patógenos microbianos y virales (Clark-Curtiss & Curtiss, 2018).

Las vacunas multiepitópos están construidas por cadenas de péptidos en segmentos unidos mediante conectores. Se caracterizan por poseer una mayor seguridad, estabilidad, menor respuesta alérgica y autoinmune, generando una respuesta inmune potente y concentrada. Presenta pocos efectos secundarios con una producción conveniente, en comparación con las vacunas tradicionales (Negahdaripour et al., 2018; Yurina & Adianingsih,

2022; Zafar et al., 2022). En los últimos años, se ha implementado el uso de microalgas para la fabricación de vacunas contra enfermedades víricas, bacterianas y parasitarias. En humanos, se han diseñado vacunas para combatir el virus de inmunodeficiencia humana, el virus del papiloma humano, la hepatitis B, entre otros. En animales, se han desarrollado prototipos contra el virus de la peste porcina clásica, el virus de la bursitis, el virus del síndrome de la mancha blanca, entre otras (M.-J. ; Kim et al., 2023; Ramos-Vega et al., 2021). La *Chlorella*, posee una pared celular rígida, característica de las microalgas, que facilita la encapsulación de proteínas recombinantes protegiéndolas de cambios bruscos de pH y de enzimas digestivas. Las microalgas son generalmente conocidas como seguras, su conservación por liofilización y su acumulación de biomasa, han sido precursores para su implementación como vía de administración de vacunas (Jiji et al., 2023; M.-J. ; Kim et al., 2023).

Justificación

Los recientes brotes de *Salmonella* en productos alimenticios derivados de carne de aves, han llevado a plantearse acerca de la efectividad de los controles de calidad dentro de la línea de producción en las granjas avícolas. El propósito de la producción avícola es proteger a las aves contra la contaminación por microorganismos. Los métodos implementados dentro de la granja y las instalaciones de procesado comprenden el principal obstáculo para la salmonela (Nair & Kollanoor Johny, 2019). Otro método comúnmente empleado es el uso de antibióticos. Sin embargo, su uso excesivo ha generado una resistencia bacteriana significativa, dificultando el control y el tratamiento de las enfermedades dentro de la línea de producción (D. Kumar et al., 2019). Este déficit ha ocasionado importantes pérdidas económicas en los sectores avícolas, e inclusive en los sectores de salud pública. Sumado a esto, la diversidad de serovares de salmonela constituye otro problema en el control de bioseguridad dentro de las granjas (Y. Kumar et al., 2019).

Según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud, durante el 2019 se registraron 594 000 casos de enfermedades gastrointestinales a causa de *Salmonella* (World Health Organization, 2024). De estos casos, el 99 % se atribuyen a la subespecie entérica, responsable de alrededor de los 1 547 serovares de *Salmonella* (Ferrari et al., 2019). En el transcurso de cinco años, más de 1 000 casos se han reportado en diferentes países del mundo, de los cuales cerca de 250 casos mostraron resistencia a los antibióticos. A pesar de los

controles en las líneas de producción y granjas avícolas, se registró un incremento del 23.6 % entre el 2015 y el 2016 en la Unión Europea (Popa & Popa, 2021). Actualmente, se han presentado nuevos brotes en la Unión Europea y los E.E.U.U (Global Food Safety International, 2024; Martínez, 2024). Esto implica que, a pesar de los constantes métodos de bioseguridad, no es posible mantener bajo control nuevos brotes.

El impacto de las enfermedades, los cambios epidemiológicos, el bajo nivel de afectación en la población y el gasto sanitario, constituyen los factores que permitieron la evolución de las vacunas en las últimas décadas (Fernández-Prada et al., 2020). Las vacunas han demostrado ser la mejor vía para controlar nuevos brotes de enfermedades bacterianas, parasitarias y víricas, debido a su capacidad de generar respuestas inmunes humorales y celulares a largo plazo. Aquí entra la importancia de las vacunas multiepítipo, las cuales han demostrado ser más accesibles, económicas en su producción, son estables y con una respuesta alérgica muy baja (Negahdaripour et al., 2018; Yurina & Adianingsih, 2022; Zafar et al., 2022). Su diseño *in silico*, ha facilitado tener resultados previos dando paso a la corrección o mejora del diseño, con el fin de evitar menos riesgo de daños durante los procesos de prueba en animales.

Es así, que el diseño de un método capaz de generar una respuesta inmunológica a largo plazo es esencial para el sector avícola y el sector de salud pública. La vacunación de las aves de corral está enfocada en la reducción de los signos clínicos y la excreción en las aves infectadas. La clave en la implementación de las vacunas multiepítipo basadas en los patógenos causantes de la enfermedad, es provocar una respuesta inmunitaria en los pollos. Por ello, la principal estrategia es producir vacunas de mayor inmunogenicidad, a través del tipo de vacuna y la aplicación de adyuvantes.

Objetivos

Objetivo General

Diseñar una vacuna multiepítopo en base a la proteína *fimH* contra la salmonelosis mediante el uso de herramientas bioinformáticas e inmunoinformáticas.

Objetivos específicos

Diseñar un candidato viable para vacuna multiepítopo contra *Salmonella* spp.

Identificar que epítomos cumplen con las mejores características para la vacuna.

Analizar la respuesta inmunológica de la vacuna multiepítopo diseñada.

Modelar la expresión y clonación *in silico* de la vacuna multiepítopo en *Chlorella vulgaris*.

Hipótesis o pregunta de investigación

El diseño de una vacuna multiepítopo mediante el uso de herramientas inmunoinformáticas en base a la proteína *fimH* de la *Salmonella typhimurium* es un prototipo capaz de generar una respuesta inmune innata, además de poder ser expresada en *Chlorella vulgaris* para su futura reproducción *in vivo* o *in vitro*.

Materiales y métodos

Selección de la proteína fimH en Salmonella typhimurium

Para la identificación de la secuencia correspondiente a la proteína *fimH* se tomó el genoma completo de *Salmonella typhimurium* del artículo realizado por (Kisiela et al., 2005) obtenida de la base de datos del NCBI, con número de acceso L19338. Dentro de la secuencia previamente mencionada, se identificó la sección comprendida entre los aminoácidos 5622 y 6629, como *fimH*, el cual presenta un código AA75420.1 para NCBI. Para comprobar que la proteína seleccionada es candidata a una vacuna, se realizó una prueba de antigenicidad a través del programa Vaxijen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). Es uno de los primeros servidores empleados en la predicción independiente de la alineación de antígenos protectores. Se desarrolló con el fin de clasificar los antígenos en base a sus propiedades fisicoquímicas. Dentro de los parámetros de selección se considera un score ≥ 0.4 . Vaxijen facilita la predicción independiente de los antígenos protectores de origen bacteriano, viral y tumoral, esta cualidad de Vaxijen lo convierte en el programa más usado para la selección de epítomos (Doytchinova & Flower, 2007).

Predicción de epítomos CTL y HTL

La selección de epítomos requiere de una serie de pruebas para determinar si son capaces de generar una respuesta inmunológica y por ende, adecuados para una vacuna. Se parte de la secuencia fasta de la proteína seleccionada, la *fimH*. Esta secuencia se ingresa en los programas NetCTL 1.2 y IEDB MHC-II. Servidores especializados para identificar epítomos.

La predicción de los epítomos CTL se realizó a través del servidor web en línea NetCTL 1.2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetCTL-1.2/>). NetCTL 1.2 se caracteriza por la predicción de epítomos CTL en cualquier proteína al integrar predicciones de escisión proteasomal, eficiencia de transporte TAP y afinidad MHC clase I. Destacándolo sobre otros servidores de predicción de CTL (Larsen et al., 2007). Se basa en el uso de un algoritmo de red neuronal artificial con score de 0.75 (Adam, 2021). Se consideró los parámetros de HLA presentes en el programa A1, A2, A3, A24, A26, B8, B27, B39, B34, B58 y B62, con una longitud de 9-mer. Una vez obtenidos los CTL por el NetCTL 1.2, se analizó su alergenicidad a través del programa AlgPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred2/>). Este programa

predice proteínas alergénicas y las regiones alergénicas de una proteína. Emplea BLAST, MERCI y ML combinados, dando puntuaciones globales para asignar a la proteína como alergénica o no alergénica (Sharma et al., 2021). Los péptidos alergénicos obtenidos se sometieron a una prueba de antigenicidad mediante Vaxijen v2.0 con un score ≥ 0.4 . Obtenida su alergenicidad y antigenicidad, los péptidos se sometieron a un análisis de toxicidad mediante el servidor web ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>). Conocer la toxicidad de los péptidos con fines terapéuticos antes de su síntesis permite agilizar el desarrollo de fármacos y vacunas. ToxinPred está basado en aprendizaje automático de vectores de soporte (SVM) para determinar si una proteína es tóxica o no tóxica, acorde a sus propiedades fisicoquímicas (Gupta et al., 2013). Finalmente, las secuencias obtenidas después de las pruebas mencionadas previamente se sometieron a un análisis de inmunogenicidad mediante IEDB Class I Immunogenicity (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>). Los CTL tienen que reconocer los péptidos presentes en las moléculas del MHC para activarse y provocar sus funciones efectoras. Siendo unos más inmunogénicos que otros. El programa IEDB Class I Immunogenicity determina aquellas secuencias que poseen mayor capacidad inmunogénica.

Los HTL fueron predichos a través de IEDB MHC-II (<http://tools.iedb.org/mhcii/>). Este programa realiza un análisis en base a las moléculas MHC-II que presentan péptidos derivados de proteínas tomadas del medio extracelular. IEDB MHC-II usa cerca del 90% de los datos de estudios que utilizan moléculas MHC-II purificadas, y el 10% restante proceden de ensayos celulares. De esa manera los HTL predichos estimulan la inmunidad celular y humoral (Nielsen et al., 2010). Para los parámetros se consideró una longitud de 15-mer y el método consensus que abarca una combinación de ANN, SNN y Librería Combinada (Fleri et al., 2017). Una vez seleccionados los epítomos del IEDB MHC-II, se realizó un análisis de alergenicidad mediante el programa AlgPred2. Posteriormente, las secuencias resultantes de AlgPred2 fueron analizadas por el servidor Vaxijen v2.0 para determinar aquellas secuencias que son antigénicas. Dichos péptidos alergénicos y antigénicos se analizaron en ToxinPred para su correspondiente análisis de toxicidad. Por último, se hizo un análisis de interferón gamma mediante el servidor IFN epitope (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/>) en las secuencias previamente obtenidas. Los HTL generan interferón gamma, un aspecto esencial para el control de infecciones. Por ello, se requiere identificar los epítomos capaces de estimular la producción de IFN-gamma. El programa IFN epitope identifica los ligandos de MHC-II que activan a los HTL que inducen IFN-gamma (Dhanda et al., 2013). IFN epitope se basa en el método Motif

y SVM. Finalizada la predicción de los epítomos CTL y HTL es importante realizar una revisión de todas las secuencias, para evitar superposiciones durante la construcción de la vacuna. Con esto se pretende establecer la selección de los epítomos adecuados para generar una respuesta inmune estable.

Construcción de la vacuna multiepítopo

Diseño de la secuencia

La eficiencia de la vacuna multiepítopo radica en su construcción, es decir en la selección de los CTL y HTL previamente obtenidos, como se unen entre sí y el adyuvante seleccionado. Los epítomos constituyen la parte esencial de la vacuna y como se encuentran enlazados es crucial. Los linkers o enlazadores garantizan la funcionalidad de la vacuna (Parvizpour et al., 2020). Por ello, los CTL se unieron mediante el conector AAY y los HTL con el conector GPGPG. Se empleó la beta defensina 3 o gallinacin-3 (GenBank: ADM21207.1) obtenido del organismo *Gallus gallus*, con una longitud de 44 aminoácidos, y el lipopolisacárido (LPS) (GenBank: AWO09227.1) con una longitud de 360 aminoácidos como adyuvantes. Los adyuvantes a usar constituyen los más empleados para la construcción de vacunas multiepítomos, ya que potencian las cualidades de la vacuna. Ambos adyuvantes se conectaron mediante EAAAK con la parte N-terminal de la vacuna. Este enlazador se utiliza para mantener la distancia entre los dominios y mejorar la estabilidad de la proteína (Martinelli, 2022).

Estructura, predicción y validación

La estructura, predicción y validación de la vacuna multiepítopo es importante para determinar que el diseño elaborado es viable para su producción, pero sobretodo posee cualidades de una proteína natural. Para la predicción de la estructura 3D se usó trRosetta (<https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/trRosetta/>). El programa trRosetta se distingue de otros servidores por su rapidez y precisión en la predicción de estructuras de novo. Ya que, para la predicción de la estructura de la vacuna usa la técnica de aprendizaje profundo (Du et al., 2021). Se ingresó en el servidor de trRosetta la secuencia fasta de los constructos 1 y 2. Posteriormente, trRosetta devuelve el resultado en formato PDB. El archivo PDB de cada

constructo se ingresa en el servidor ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) para revisar la estructura 3D del modelo y sus posibles errores. La verificación del modelo se realiza a través del z-score, el cual indica la calidad general a través de la desviación de la energía total de la estructura. ProSA-web arroja un z-score en base a la puntuación de proteínas determinadas experimentalmente y se encuentran contenidas en Protein Data Bank (PDB) mediante un gráfico de puntuaciones (Wiederstein & Sippl, 2007). Otro medio de validación de los constructos es mediante el gráfico de Ramachandran, el cual se obtuvo con el servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>). MolProbity analiza el formato PDB de los constructos y permite la validación sólida de amplio espectro. Se basa en la potencia y la sensibilidad proporcionadas por la distribución optimizada de hidrógenos y el análisis de contactos de todos los átomos (V. B. Chen et al., 2010). El gráfico de Ramachandran informa la distribución de los ángulos de torsión de la proteína y a su vez determina la calidad y la normalidad en base a un Rama-z score entre valores de -3 a 3, indicando el número de residuos que se presentan en las regiones “atípicas”, “permitidas” y “favorecidas” (Sobolev et al., 2020).

Análisis de la vacuna multiepítopo

La vacuna paso por un análisis de alergenicidad a través de AlgPred2. Una prueba de antigenicidad mediante Vaxijen v2.0 con resultados > 0.4. Y un análisis de propiedades físico – químicas mediante el servidor ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), este programa permite calcular si los constructos son estables para su producción. La principal base de ExPASy ProtParam es su alto grado de integración e interconectividad que establece entre todas las bases de datos (Gasteiger et al., 2003). Esta interacción facilita la identificación de los parámetros esenciales como el número de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico (pI) teórico, el índice de inestabilidad, el índice alifático, la estabilidad (bacterias, levaduras y mamíferos), y valor medio de hidropatía (GRAVY).

Predicción de los epítomos de células B

Para activar las células B de memoria se necesita el reconocimiento de determinantes antigénicos claves para el desarrollo de vacunas contra los patógenos extracelulares. Los

epítomos de células B tienen una gran afinidad por dos tipos de determinantes antigénicos de células B: epítomos continuos (lineales) y discontinuos (conformacionales) (Parvizpour et al., 2020). En la detección de los epítomos de células B lineales y discontinuas contra un antígeno específico, se ingresó el formato PDB de los constructos en el programa ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>). ElliPro se basa en la estructura tridimensional y proporciona la puntuación resultante como índice de protrusión (PI). A su vez que permite obtener los epítomos lineales y discontinuas basado en la estructura 3D de la proteína, a diferencia de otros servidores. Las especificaciones para la predicción se dejaron según las establecidas por el programa.

Dinámica molecular de la vacuna

Para la dinámica molecular se tomó como receptor el TLR4 (PDB ID: 3fxi). El receptor se pasó por el programa Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) para estructurar la molécula. El ligando correspondiente a la vacuna constituye dos diseños dependiendo del tipo de adyuvante que presentan, etiquetándose como constructo 1 conformado por la beta defensina 3 y el constructo 2 por el LPS. Ambos diseños de la vacuna y el receptor se ingresaron al servidor RING v4.0 (<https://ring.biocomputingup.it/>). Generador de Redes de Interacción de Residuos (RING) identifica las interacciones no covalentes desde un nivel atómico en las estructuras proteicas. A su vez procesa estructuras como dinámica molecular y conjuntos estructurales, generando redes probabilísticas y mapas de contactos. A través de este programa se identificó las interacciones de residuos activos, los cuales se usarán para el proceso de docking molecular. High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing (HADDOCK 2.4) (<https://wenmr.science.uu.nl/>) es una plataforma para el modelado de biomoléculas complejas. HADDOCK es un popular programa de acoplamiento que adopta un enfoque de acoplamiento basado en datos, en forma de información sobre la región de interfaz entre los componentes moleculares y/o sus orientaciones relativas (De Vries et al., 2010). De acuerdo con HADDOCK el cluster superior es el más fiable y los resultados más negativos de HADDOCK score y Z score significan mejores estructuras e interacción (van Zundert & Bonvin, 2014). Las estructuras obtenidas a través del docking se visualizan mediante el programa LigPlot+ v2.2.8. LigPlot permite generar representaciones en 2D de complejos proteína – ligando, a color o blanco y negro, a su vez permite una representación sencilla de las interacciones

intermoleculares y su fuerza, los enlaces de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas y las accesibilidades a los átomos (Wallace et al., 1995).

Simulación inmunológica de la vacuna

El servidor C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php?page=1>) se empleó para la prueba de la respuesta inmune de ambos constructos. El simulador permite generara un programa de inyección virtual el cual mostrara la correspondiente respuesta inmunitaria de existir a los péptidos identificados en las secuencias dadas (Rapin et al., 2011). Utiliza técnicas de aprendizaje automático que le permite predecir respuestas inmunitarias basadas en ganglios linfáticos, timo y médula ósea (Abdi et al., 2022). Para el constructo 1 se empleó los parámetros dados por el servidor. Mientras que para el constructo 2 se modificó los parámetros; en el haplotipo del huésped se usó HLA-A*A0101, HLA-A*A0102, HLA-B*B0702, HLA-B*B0704, HLA-DR*DRB1_0101 y HLA-DR*DRB1_0102. Además, se especificó que la vacuna presenta LPS, adyuvante igual a 200 y un número de Ag para inyectar igual a 2 000.

Optimización de codón y clonación

El servidor VectorBuilder (<https://en.vectorbuilder.com/tool/codon-optimization.html>) ofrece soluciones de administración de genes capaces de cubrir todas las necesidades clínicas y de investigación. Para el proceso de optimización de las secuencias de los constructos, se seleccionó al alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* como el organismo huésped, para obtener el índice de optimización de codones (CAI) y el contenido de GC. El índice CAI representa la media geométrica en el cual el uso de codones de un gen se adapta al uso de codones de genes altamente expresados en un genoma, entre un rango de 0.1 y 0.0 donde a mayor valor CAI mejor es la expresión del gen (Sen et al., 2020). Para la clonación *in silico* se tomó dos plásmidos pGreen 0029 y pGreenII 0179 cuya secuencia se obtuvo de la página SnapGene. Se ha registrado que ambos plásmidos han sido empleados en la digestión con microalgas (Gadamchetty et al., 2019; Yadav & Sen, 2017). Las secuencias de los constructos optimizados se insertaron en los vectores seleccionados mediante el programa Benchling (<https://www.benchling.com/>). Este programa es una plataforma informática de laboratorio

next-gen usado por grupos académicos e investigadores. Permite usar una variedad de herramientas para procesos de diseño de primers, plásmidos, PCR, digestión por enzimas y otras técnicas de clonación molecular (Davies, 2020).

Resultados

Selección de la proteína fimH y prueba de antigenicidad

La proteína *fimH*, una fimbria encontrada en bacterias Gram negativas, juega un papel crucial en el mecanismo de adherencia de la *Salmonella* spp. Esta proteína permite a la bacteria reconocer y unirse a moléculas receptoras en las células del huésped, lo que facilita su ingreso. Además, el análisis de antigenicidad de la proteína *fimH* arrojó un valor de 0.6134, identificándola como antigénica. Esto sugiere que puede desencadenar una respuesta inmune en el organismo hospedero (**Figura 1**).

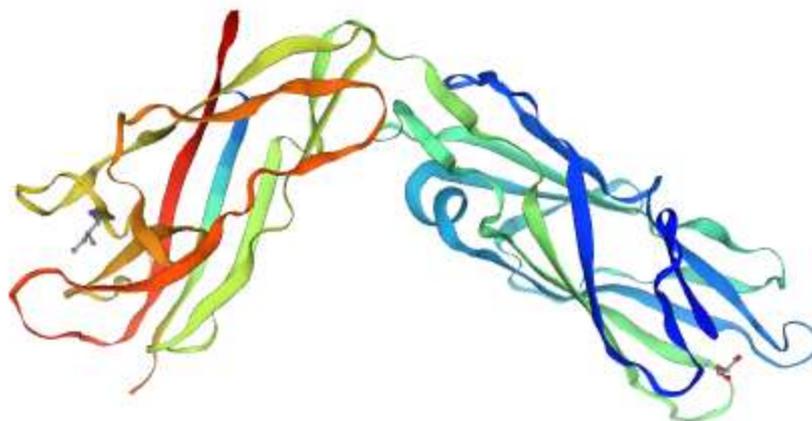


Figura 1: Estructura 3D de la proteína fimH. Se presenta una sola cadena de fimH. Esta estructura fue modelada en el programa SwissModel.

Predicción de epítomos CTL y HTL

Las células T citotóxicas (CTL) son importantes en la respuesta inmunitaria del huésped ante la presencia de patógenos intracelulares virales y bacterianos (Wonderlich et al., 2018). Utilizando el servidor NetCTL 1.2, se obtuvieron inicialmente un total de 115 péptidos, usando los super types establecidos por el servidor. Estos super types es un conjunto de HLA con una amplia distribución en la población, esto significa que si un péptido se puede unir a un alelo

dentro de un super type, puede también unirse a todos los alelos dentro de ese super type (Lund et al., 2004). Posteriormente, los péptidos resultantes se sometieron a una prueba de alergenicidad, antigenicidad y toxicidad, resultando en un total de 17 péptidos en las tres pruebas. Finalmente, en la prueba de inmunogenicidad acorde al valor más alto se obtuvo dos péptidos finales que cumplen con todas las pruebas. En la **Tabla 1**, se puede observar los CTL finales, que son antigénicos al tener valores mayores a 0.4, no alergénicos, no tóxicos y una inmunogenicidad positiva, dentro de un rango poblacional acorde a los super types B7 y A2.

Tabla 1: Predicción de 2 epítomos CTL mediante NetCTL 1.2, AlgPred, Vaxijen v4.0, ToxinPred y Class I Immunogenicity.

Péptidos	Posición	Super types	NetCTL	Alergenicidad	Antigenicidad	Toxicidad	Inmunogenicidad
AARVGIR AW	302	B7	1,1011<- E	Non- Allergen	1,0027	Non- Toxin	0,28316
ILMGVD YNV	125	A2	1,3453<- E	Non- Allergen	1,1997	Non- Toxin	0,03128

Las células T helper (HTL) generan una respuesta inmune celular y humoral en el huésped contra las infecciones (Zheng et al., 2020). Mediante el servidor IEDB MHC-II y el método consensus, se tomaron 27 alelos humanos presentes en el servidor. No se registra una base de datos específica con alelos de pollos, sin embargo, los alelos humanos poseen una pequeña similitud con alelos de pollos (Fatoba et al., 2022), ya que se descubrieron alelos MHC en pollos, y se extendieron a los mamíferos (Tregaskes & Kaufman, 2021). Se obtuvo primeramente 1 696 péptidos acorde al percentil-rank más bajo, debido a su capacidad de poseer una mayor afinidad de unión. Al igual que en los CTL, los alelos representan los enlaces posibles de los epítomos en relación a la diversidad poblacional, capaces de generar una respuesta inmune. Luego se sometieron a una prueba de alergenicidad donde resultaron 434 péptidos no alergénicos. Estos 434 péptidos pasaron por una prueba de antigenicidad, dando 259 péptidos antigénicos. Con la prueba de toxicidad se mantuvieron los 259 péptidos no tóxicos. Finalmente, en la prueba de IFN gamma, de los 259 péptidos se obtuvieron 22 que epítomos con un valor positivo por lo tanto puede inducir una respuesta inmune. Todos los valores obtenidos de cada prueba de selección de HTL se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Predicción de HTL mediante IEDB MHC-II, AlgPred, Vaxijen, ToxinPred e IFN-Epitope.

Alelos	Start	End	Length	Péptidos	Percentile _rank	Alergenicidad	Antigenicidad	Toxicidad	IFN- gamma				
HLA- DRB1*15:01	148	162	15	FKLKVIR PFINMVTI	0,09	0,22	Non- Allergen	0,5293	Antigen	-0,8	Non- Toxin	0,5722	+
HLA- DRB1*12:01	146	160	15	LVFKLKV IRPFINMV	1,19	0,18	Non- Allergen	0,5204	Antigen	-0,67	Non- Toxin	0,8049	+
HLA- DPA1*02:01/DPB 1*05:01	145	159	15	KLVFKLK VIRPFINM	1,2	0,19	Non- Allergen	0,7199	Antigen	-0,73	Non- Toxin	0,6698	+
HLA- DRB1*01:01	94	108	15	NFKYLKL NDYLLGA M	1,8	0,28	Non- Allergen	0,9468	Antigen	-1,34	Non- Toxin	0,2887	+
HLA- DRB1*01:01	95	109	15	FKYLKLN DYLLGA MS	2,3	0,27	Non- Allergen	0,7264	Antigen	-1,23	Non- Toxin	0,5870	+
HLA- DRB1*01:01	97	111	15	YLKLN DY LLGAMSI T	3,9	0,24	Non- Allergen	1,0199	Antigen	-1,54	Non- Toxin	0,5093	+
HLA- DRB1*01:01	96	110	15	KYLKLN D YLLGAMS I	5,1	0,22	Non- Allergen	0,7515	Antigen	-1,31	Non- Toxin	0,7289	+
HLA- DQA1*01:02/DQ B1*06:02	296	310	15	HLDDNA AARVGIR AW	5,4	0,3	Non- Allergen	1,0503	Antigen	-1,03	Non- Toxin	0,4834	+
HLA- DRB1*01:01	99	113	15	KLNDYLL GAMSITD S	6	0,28	Non- Allergen	0,7272	Antigen	-1,42	Non- Toxin	0,3609	+

HLA-DRB1*01:01	100	114	15	LNDYLLG AMSITDS V	6,5	0,25	Non-Allergen	0,4235	Antigen	-1,32	Non-Toxin	0,2545	+
HLA-DRB1*01:01	98	112	15	LKLNDYL LGAMSIT D	6,7	0,28	Non-Allergen	0,9016	Antigen	-1,49	Non-Toxin	0,3296	+
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	254	268	15	RLEAEKA SGQAMV SD	6,9	0,29	Non-Allergen	1,1026	Antigen	-1,22	Non-Toxin	0,5101	+
HLA-DRB1*04:01	247	261	15	AQAYLS MRLEAEK AS	8,1	0,3	Non-Allergen	1,0624	Antigen	-1,56	Non-Toxin	0,1274	+
HLA-DRB1*04:01	248	262	15	QAYLSM RLEAEKA SG	8,6	0,28	Non-Allergen	1,2243	Antigen	-1,72	Non-Toxin	0,1712	+
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	102	116	15	DYLLGA MSITDSV AG	8,7	0,28	Non-Allergen	0,6337	Antigen	-1,32	Non-Toxin	0,2039	+
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	105	119	15	LGAMSIT DSVAGVS Y	8,9	0,29	Non-Allergen	0,5539	Antigen	-1,41	Non-Toxin	0,2282	+
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	103	117	15	YLLGAMS ITDSVAG V	9,6	0,25	Non-Allergen	0,4764	Antigen	-1,54	Non-Toxin	0,2193	+
HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	104	118	15	LLGAMSI TDSVAGV S	11	0,23	Non-Allergen	0,5245	Antigen	-1,5	Non-Toxin	0,1158	+
HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	120	134	15	PPRNYIL MGVDYN VS	13	0,3	Non-Allergen	0,3455	Antigen	-1,07	Non-Toxin	0,0898	+

HLA- DRB1*04:01	249	263	15	AYLSMRL EAEKASG Q	15	0,28	Non- Allergen	1,4542	Antigen	-1,64	Non- Toxin	0,0237	+
HLA- DQA1*05:01/DQ B1*03:01	253	267	15	MRLEAEK ASGQAM VS	16	0,27	Non- Allergen	1,2082	Antigen	-1,62	Non- Toxin	0,3967	+
HLA- DRB1*04:01	250	264	15	YLSMRLE AEKASGQ A	17	0,28	Non- Allergen	1,5619	Antigen	-1,7	Non- Toxin	0,2013	+

Tabla 3: Epítomos HTL finales sin superponerse, que se usaran para el diseño de la vacuna.

Alelos	Start	End	Length	Péptidos	Percentile rank	Alergenicidad	Antigenicidad	Toxicidad	IFN- gamma				
HLA- DRB1*15:01	148	162	15	FKLKVIRPFI NMVTI	0,09	0,2 2	Non- Allergen	0,5293	Antigen	-0,8	Non- Toxin	0,572 2	+
HLA- DRB1*01:01	94	108	15	NFKYLKLN DYLLGAM	1,8	0,2 8	Non- Allergen	0,9468	Antigen	- 1,34	Non- Toxin	0,288 7	+
HLA- DQA1*05:01/ DQB1*03:01	254	268	15	RLEAEKAS GQAMVSD	6,9	0,2 9	Non- Allergen	1,1026	Antigen	- 1,22	Non- Toxin	0,510 1	+
HLA- DQA1*05:01/ DQB1*02:01	120	134	15	PPRNYILMG VDYNVS	13	0,3	Non- Allergen	0,3455	Antigen	- 1,07	Non- Toxin	0,089 8	+
HLA- DQA1*01:02/ DQB1*06:02	296	310	15	HLDDNAAA RVGIRAW	5,4	0,3	Non- Allergen	1,0503	Antigen	- 1,03	Non- Toxin	0,483 4	+

Construcción de la vacuna multiepitopo

Para la construcción de la vacuna, se analizó que los epítomos no se superpongan entre sí. Se utilizaron un total de 7 epítomos para la vacuna, 2 CTL y 5 HTL (**Tabla 1** y **Tabla 3**), los cuales se conectaron a través de los enlazadores AAY y GPGPG respectivamente. El conector EAAAK se unió a la parte N-terminal de la vacuna con el fin de incrementar la capacidad de respuesta inmunitaria apropiada y protectora mediante un adyuvante. Los dos adyuvantes empleados fueron la beta defensina 3 y el lipopolisacárido (LPS). Se diseñó dos constructos, el constructo 1 con la beta defensina 3 y el constructo 2 con el LPS. Los adyuvantes están señalados en verde y su conector en azul, los CTL se encuentran con color celeste y se unen por el conector en rojo, mientras que los HTL se presentan de color rosado y su conector en amarillo.

Constructo 1

CRFPHIAIGKCATFISCCGRAYEVDALNSVRTSPWLLAPGNPHEAA
AKAARV**GIRAW**AAYILMGVDY**NV**GPGPGNFKYLKLNDYLLGAMG
PGPGPPRNYILMGVDY**VS**GPGPGFKLKVIRPFINMVTIGPG**GRLE**
AEKASGQAMVSDGPG**PHLDDNA**AARV**GIRAW**

Constructo 2

MQPFGLDRYIGKTIFTTIMMTLFMLVLSLGGIIFVDQLKKAGQGN
YDALGAGMYTLLSVPKDIQIFFPMAALLGALLGLGMLAQRSELVV
MQASGFTRMQVALSVMKTAIPLVLLTMAIGEWVAPQGEQMARN
YRAQAMYGGSELLSTQQGLWAKDGNNFVYIERVKGDEELAGISY
AFNDQRRLLQSVRYAASAKFDPEHKVWRLSQVDESDLQNPQITG
SQTVSGTWKTNLTPDKLGVVALDPDALSISGLHNYVKYLKSSGQD
AGRYQLNMWSKIFQPLSVAVMMLMALSIFIGPLRSVPMGVRVVT
GISFGFVYVLDQIFGPLTLVYGIPPIVGALLPSASFFLISLWMLRK
SEAAAKAARV**GIRAW**AAYILMGVDY**NV**GPGPGNFKYLKLNDY**L**
LGAMGPGPGPPRNYILMGVDY**VS**GPGPGFKLKVIRPFINMVTIG**P**
GPGRLEAEKASGQAMVSDGPG**PHLDDNA**AARV**GIRAW**

Estructura, predicción, validación de la vacuna multiepitopo

A través de trRosseta, se construyó la estructura 3D del constructo 1 y el constructo 2 (**Figura 2** y **Figura 3** respectivamente). La predicción 3D se basa en la minimización de energía, debido a la red neuronal empleada por el servidor para la predicción de geometrías (Du et al., 2021).

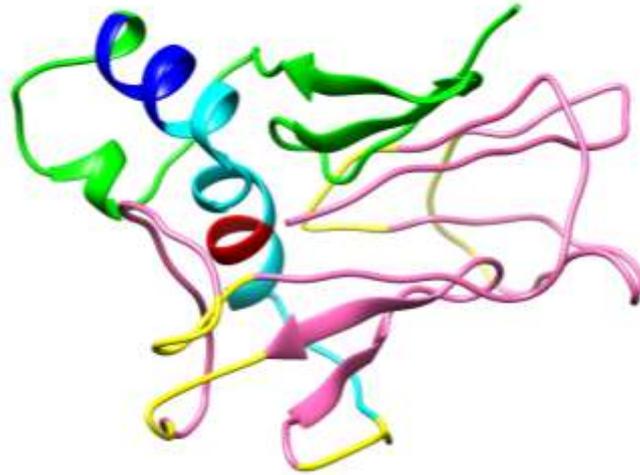


Figura 2: Estructura 3D del constructo 1. La estructura esta constituida de un adyuvante (color verde), un enlazador del adyuvante EAAAK (color azul), dos epítomos de CTL (color celeste), un enlazador de CTL AAY (color rojo), cinco epítomos de HTL (color rosado) y cinco enlazadors de HTL GPGPG (color Amarillo). Modelo obtenido del servidor trRosseta y UCSF Chimera para el color.

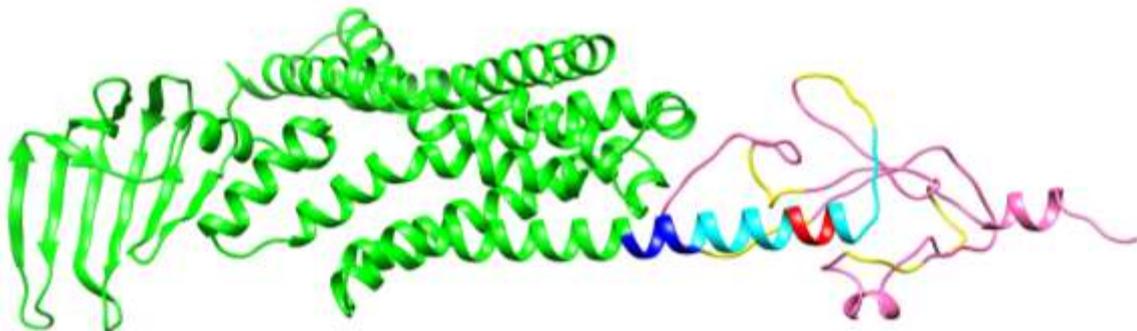


Figura 3: Estructura 3D del constructo 2. La estructura esta constituida de un adyuvante (color verde), un enlazador del adyuvante EAAAK (color azul), dos epítomos de CTL (color celeste),

un enlazador de CTL AAY (color rojo), cinco epítomos de HTL (color rosado) y cinco enlazadores de HTL GPGPG (color Amarillo). Modelo obtenido del servidor trRosetta y UCSF Chimera para el color.

Los modelos de los constructos de la vacuna obtenidos mediante trRosetta, se sometieron a un análisis en ProSA-web. Los z-scores obtenidos fueron de -6.31 y -6.8 para el constructo 1 y el constructo 2, respectivamente. Ambos z-scores indican que los constructos se encuentran dentro de un rango comparable al de una proteína nativa (**Figura 4A** y **Figura 5A**). A su vez se analizó los gráficos de energía de cada constructo. Dichos graficas indican la calidad del modelo en relación con las energías acorde a la posición i -ésima de la secuencia de aminoácidos. Los valores positivos representan partes problemáticas o erróneas del modelo (Wiederstein & Sippl, 2007). En base a esto, en el constructo 1 la gráfica de energía muestra valores negativos, lo que sugiere un modelo de buena calidad (**Figura 4B**). Por otro lado, el constructo 2 presenta tantos valores negativos con una pequeña fracción de valores positivos, lo que permite identificar que el modelo tiene una calidad aceptable (**Figura 5B**).

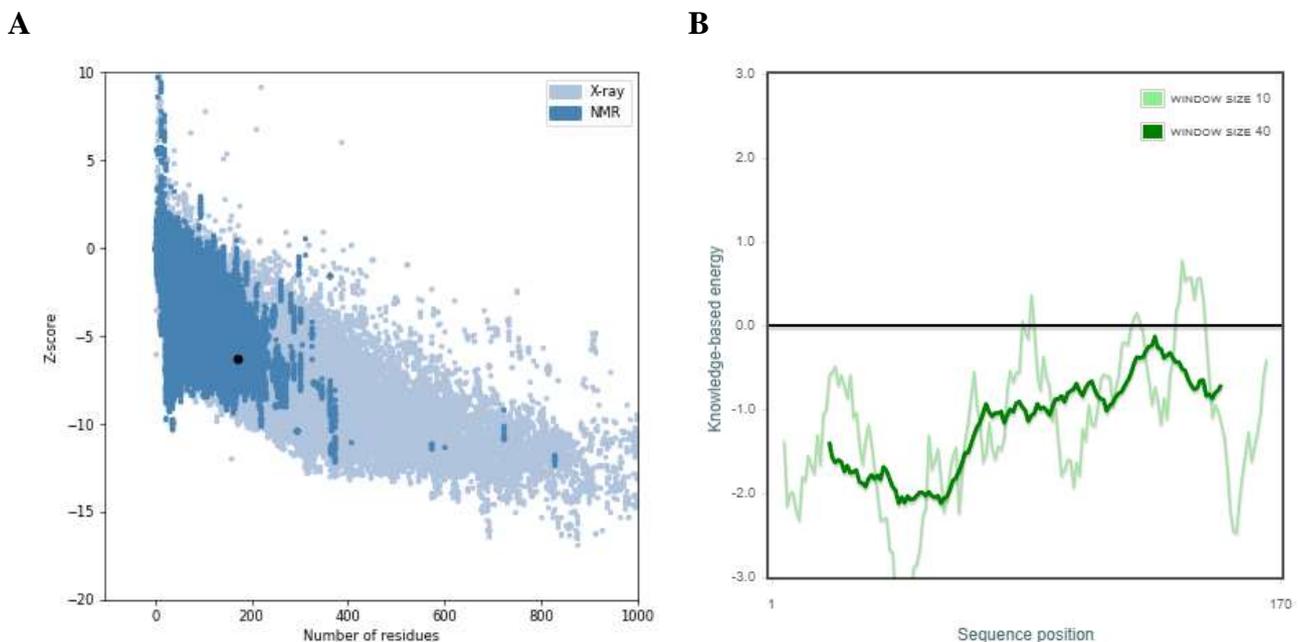


Figura 4: Análisis de la vacuna multiepítopo. (A) Diagrama de calidad que refleja la naturalidad del constructo 1, como una proteína nativa. (B) Diagrama de energía del constructo 1 donde se muestran las posiciones de los aminoácidos con un rango negativo favorable.

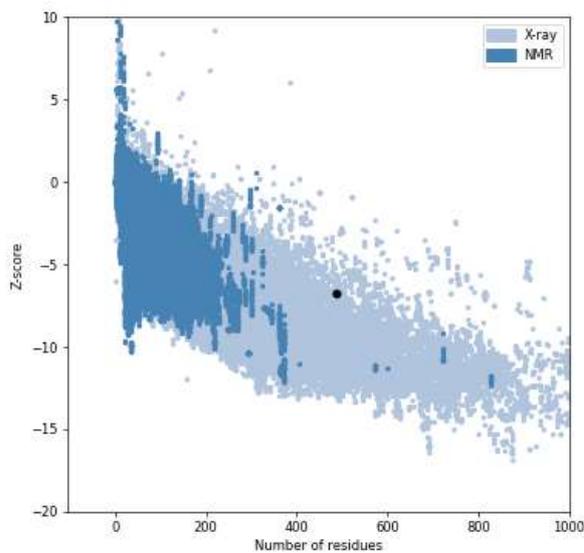
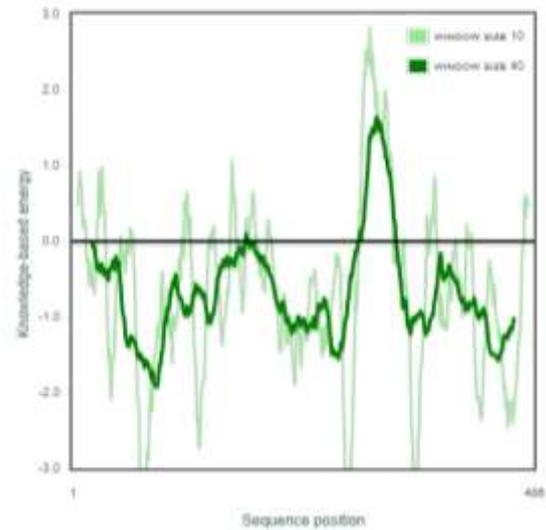
A**B**

Figura 5: Análisis de calidad de la vacuna multiepítipo. **(A)** Diagrama de calidad que refleja la naturalidad del constructo 2 que se considera casi nativa. **(B)** Diagrama de energía del constructo 2 donde se muestran las posiciones de los aminoácidos entre rangos negativos y positivos.

Los modelos de ambos constructos se sometieron a un análisis de Ramachandran. El diagrama de Ramachandran para el constructo 1, muestra pocos valores atípicos y una cantidad distribuida de valores aceptables dentro de la región favorecida (**Figura 6A**). Esta interpretación se complementa por el Rama-z score el cual es de -2.57 ± 0.54 . Para el constructo 2, el diagrama de Ramachandran presenta una variada y concentrada cantidad de residuos dentro de la zona favorable, con muy pocos valores atípicos. Su Rama-z score es 0.55 ± 0.38 (**Figura 6B**). Ambos resultados sugieren que los ángulos de torsión de cada vacuna se pueden interpretar como estructuras de calidad, ya que gran parte de los residuos se encuentran dentro de las regiones permitidas o favorecidas. Además, los valores de los Ramas-z score se encuentra dentro de la métrica de calidad de -3 a 3, reforzando lo observado en ambos diagramas.

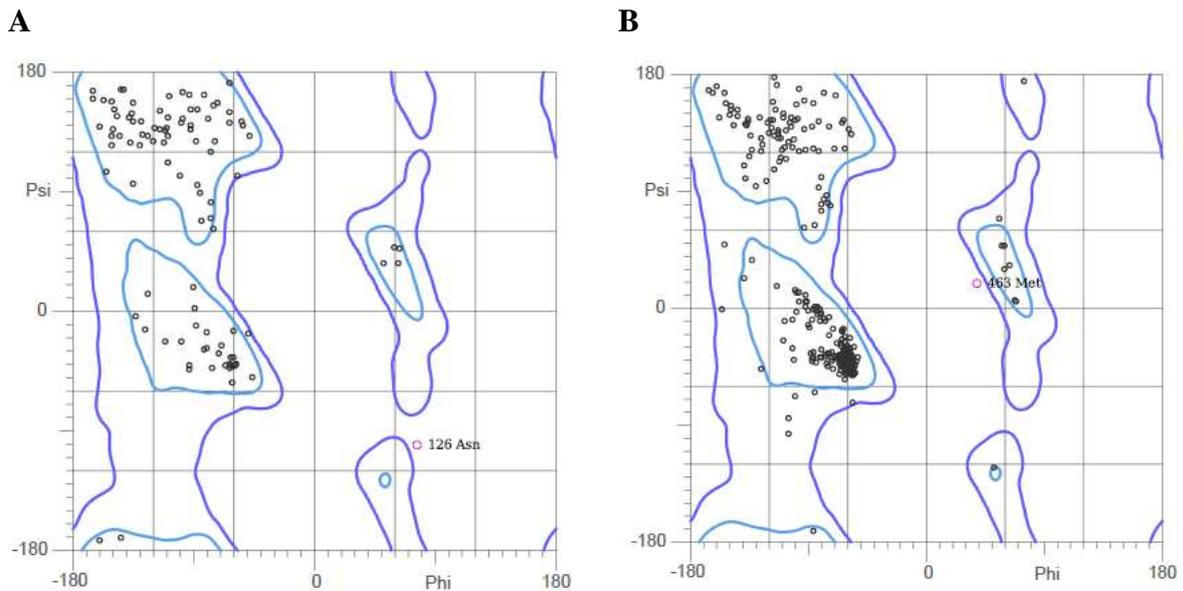


Figura 6: Diagrama de Ramachandran. (A) En el constructo 1 se presenta valores dentro de la zona de aceptación mientras que en el constructo 2 (B) muestra una gran cantidad de valores en la zona de aceptación.

Análisis de la vacuna multiepitopo

Ambos constructos pasaron por un análisis de antigenicidad y alergenicidad. Los valores de antigenicidad se determinaron mediante un score > 0.4 en el servidor Vaxijen v2.0. El constructo 1 tuvo un valor de 0.8108 y el constructo 2 de 0.574, determinando su capacidad antigénica de desencadenar una respuesta inmune eficiente. El análisis de alergenicidad de los constructos permitió verificar si algún componente en su diseño, como el tipo de adyuvante, epítopos o conectores, podría provocar o no una reacción alérgica. A través del programa AlgPred, se determinó que ambos constructos son no-alérgicos. Por lo tanto, los diseños cumplen con las características requeridas de antigenicidad y alergenicidad.

El análisis de las propiedades físico – químicas de cada vacuna se efectuó a través del servidor ExPASy ProtParam. Estas propiedades permiten determinar el comportamiento y la estabilidad de las vacunas en condiciones *in vitro*. En la **Tabla 4** se muestran las propiedades de cada constructo. Cada constructo posee una longitud y un peso molecular diferente, acorde al tamaño de su adyuvante, debido a que los enlaces y el número de CTL y HTL son los mismos. De igual manera se considera que ambos diseños son estables, debido a que su índice de inestabilidad son valores positivos y menores a 40. Un valor mayor a 40 se considera como

inestable. Un valor determinante es el GRAVY, el constructo 1 posee un valor negativo lo que indica su hidrofiliidad, mientras que el constructo 2 es hidrofóbico al tener un GRAVY positivo.

Tabla 4: Resultados de los parámetros de calidad de los constructos 1 y 2, obtenidos del servidor Expasy-ProtParam

	Constructo 1	Constructo 2
Aminoácidos	170	486
Peso molecular	17903,69	52788,82
pI teórico	9,3	9,55
Índice de inestabilidad	12,23	20,57
Índice alifático	81,59	98,33
GRAVY	-0,037	0,211

Predicción de células B

El sistema inmunológico adaptativo requiere de las células B para proporcionar una protección a largo plazo. Los epítomos son regiones presentes en la superficie de un antígeno, donde anticuerpos específicos los reconocen y se unen (Jespersen et al., 2019). La afinidad de las células B por los complejos antigénicos epítomos B lineales y discontinuos, los cuales se basan en la estructura espacial de la proteína (Galanis et al., 2021) se muestran en la **Tabla 5**. Los epítomos lineales consisten en una secuencia lineal de residuos, mientras que los epítomos discontinuos, consisten en residuos que no son contiguos, sino que están unidos por la estructura plegada de la proteína (Galanis et al., 2021). Gran parte de los epítomos de células B son discontinuos alrededor del 90 % y muy pocos lineales (Ferdous et al., 2019). Además, el número de residuos mayores a 17 aminoácidos presenta una mayor afinidad con los anticuerpos (Parvizpour et al., 2020). Es decir, que ambos constructos generan células B lineales y discontinuas. De los cuales, las células B discontinuas presentan una mayor cantidad de residuos en la superficie de ambos constructos, lo que permite su unión a las inmunoglobulinas.

Tabla 5: Predicción de epítomos de células B lineales y discontinuas del constructo 1 y constructo 2.

Predicción Epítomos Lineales						
Constructo 1						
No	Chain	Start	End	Péptidos	Número de residuos	Score
1	A	91	100	GPGPGPPRNY	10	0,725
2	A	138	165	EAEKASGQAMVSDGPGPGHLDDNAAARV	28	0,686
3	A	27	49	LNSVRTSPWLLAPGNNPHEAAAK	23	0,681
4	A	64	78	MGVDYNVGPGPGNFK	15	0,625
5	A	105	114	VDYNVSGPGP	10	0,625
6	A	1	4	CRFP	4	0,596
7	A	121	127	IRPFINM	7	0,576
Constructo 2						
No	Chain	Start	End	Péptidos	Número de residuos	Score
1	A	431	486	GFKLKVIRPFINMVTIGPGGRLEAEKASGQAMVSDGPGPGHLDDNAAARVGI RAW	56	0.833
2	A	31	57	GIKFVDQLKKAGQGNVDALGAGMYTL	27	0.798
3	A	1	10	MQPFGVLDRY	10	0.776
4	A	155	234	KDGNNFVYIERVKGDEELAGISYAFNDQRRQLQSVRYAASAKFDPEHKVWRLS QVDESDLQNPQITGSQTVSGTWKTNL	80	0.708
5	A	135	146	YRAQAMYGGSL	12	0.681
6	A	332	336	VYGIP	5	0.669
7	A	364	405	AKAARVGIRAWAAYILMGVDYNVGPGPGNFKYLKLNLYLLGA	42	0.653
8	A	95	98	SGFT	4	0.593
9	A	262	266	KSSGQ	5	0.579
10	A	148	151	TQQG	4	0.509

Predicción de Epítomos Discontinuos

Constructo 1

No	Residuos	Número de residuos	Score
1	A:C1, A:C17, A:C18, A:G19, A:R20, A:A21, A:Y22, A:R168 A:K10, A:A26, A:L27, A:N28, A:S29, A:V30, A:R31, A:T32, A:S33, A:P34, A:W35, A:L36, A:L37, A:A38, A:P39, A:G40, A:N41, A:N42, A:P43, A:H44, A:E45, A:A46, A:A48, A:K49, A:R52, A:Y68, A:N69, A:V70, A:G71, A:P72, A:G73, A:P74, A:G75, A:N76, A:F77, A:G91, A:P92, A:G93, A:P94, A:G95, A:P96, A:P97, A:R98, A:N99, A:Y100, A:G104, A:V105, A:D106, A:Y107, A:V109, A:S110, A:G111, A:P112, A:G113, A:P114, A:W170	8	0,755
2	A:R2, A:F3, A:P4, A:I121, A:R122, A:P123, A:F124, A:I125, A:N126, A:M127, A:T129, A:E138, A:A139, A:E140, A:K141, A:A142, A:S143, A:G144, A:Q145, A:A146, A:M147, A:V148, A:S149, A:D150, A:G151, A:P152, A:G153, A:P154, A:G155, A:H156, A:L157, A:D158, A:D159, A:N160, A:A161, A:A162, A:A163, A:R164, A:V165	56	0,653
3	A:K141, A:A142, A:S143, A:G144, A:Q145, A:A146, A:M147, A:V148, A:S149, A:D150, A:G151, A:P152, A:G153, A:P154, A:G155, A:H156, A:L157, A:D158, A:D159, A:N160, A:A161, A:A162, A:A163, A:R164, A:V165	39	0,638

Constructo 2

No	Residuos	Número de residuos	Score
1	A:M1, A:Q2, A:P3, A:F4, A:G5, A:V6, A:L7, A:D8, A:R9 A:E361, A:A364, A:K365, A:A367, A:R368, A:V369, A:G370, A:I371, A:R372, A:A373, A:W374, A:A375, A:A376, A:Y377, A:I378, A:L379, A:M380, A:G381, A:V382, A:D383, A:Y384, A:N385, A:V386, A:G387, A:P388, A:G389, A:P390, A:G391, A:N392, A:F393, A:K394, A:Y395, A:L396, A:K397, A:L398, A:N399, A:D400, A:Y401, A:L402, A:L403, A:G404, A:A405, A:K433, A:L434, A:K435, A:V436, A:I437, A:R438, A:P439, A:F440, A:I441, A:N442, A:M443, A:V444, A:T445, A:I446, A:G447, A:P448, A:G449, A:P450, A:G451, A:R452, A:L453, A:E454, A:A455, A:E456, A:K457, A:A458, A:S459, A:G460, A:Q461, A:A462, A:M463, A:V464, A:S465, A:D466, A:G467, A:P468, A:G469, A:P470, A:G471, A:H472, A:L473, A:D474, A:D475, A:N476, A:A477, A:A478, A:A479, A:R480, A:V481, A:G482, A:I483, A:R484	9	0.804
2	A:S28, A:G31, A:I32, A:I33, A:F35, A:V36, A:D37, A:Q38, A:L39, A:K40, A:K41, A:A42, A:G43, A:Q44, A:G45, A:N46, A:Y47, A:D48, A:A49, A:L50, A:G51, A:A52, A:G53, A:M54, A:T56, A:L57, A:Y135, A:R136, A:A137, A:Q138, A:A139, A:M140, A:Y141, A:G142, A:G143, A:S144, A:L145, A:L146, A:S147, A:T148, A:Q149, A:Q150, A:G151	94	0.758
3	A:S28, A:G31, A:I32, A:I33, A:F35, A:V36, A:D37, A:Q38, A:L39, A:K40, A:K41, A:A42, A:G43, A:Q44, A:G45, A:N46, A:Y47, A:D48, A:A49, A:L50, A:G51, A:A52, A:G53, A:M54, A:T56, A:L57, A:Y135, A:R136, A:A137, A:Q138, A:A139, A:M140, A:Y141, A:G142, A:G143, A:S144, A:L145, A:L146, A:S147, A:T148, A:Q149, A:Q150, A:G151	43	0.74

4	A:K155, A:D156, A:G157, A:N158, A:N159, A:F160, A:Y162, A:E164, A:R165, A:K167, A:G168, A:D169, A:E170, A:E171, A:A173, A:G174, A:S176, A:I177, A:Y178, A:A179, A:F180, A:N181, A:D182, A:Q183, A:R185, A:L186, A:Q187, A:S188, A:V189, A:R190, A:Y191, A:A192, A:A193, A:S194, A:A195, A:K196, A:F197, A:D198, A:P199, A:E200, A:H201, A:K202, A:V203, A:R205, A:L206, A:S207, A:Q208, A:V209, A:D210, A:E211, A:S212, A:D213, A:L214, A:Q215, A:N216, A:P217, A:K218, A:Q219, A:I220, A:T221, A:G222, A:S223, A:Q224, A:T225, A:V226, A:S227, A:G228, A:T229, A:W230, A:K231, A:T232, A:N233, A:L234, A:K262, A:S263, A:S264, A:G265, A:Q266	78	0.718
5	A:L329, A:V332, A:Y333	3	0.653
6	A:G334, A:I335, A:P336	3	0.636
7	A:S95, A:G96, A:F97, A:T98, A:Q101	5	0.584

Dinámica molecular de la vacuna multiepítopo

La dinámica molecular se realizó usando el servidor HADDOCK 2.4 junto con el programa LigPlot+ para la visualización de los resultados. Para ambos constructos, se utilizó como receptor la cadena A del TLR 4 (Figura 7). El constructo 1 registro un HADDOCK score de -56.7 y un z-score de -1.3, mientras que el constructo 2 presento un HADDOCK score de -21.2 y un z-score de -2.4. HADDOCK realiza varios análisis estadísticos o clúster determinando el más fiable, además de generar un z-score que indica las desviaciones estándar de la media en la que se encuentra cada clúster. Aquellos que muestren una puntuación negativa son considerados mejores. A través de LigPlot+ se obtuvo de manera gráfica la interacción entre el ligando (vacuna) y el receptor (TLR 4). La **Figura8A** muestra la interacción entre el constructo 1 y el TLR 4. Mediante enlaces de hidrógeno (color verde) se unen los residuos Pro27 (B), Ser29 (B) y Lys31 (B) (color naranja) con el ligando Thr30 (B) (color púrpura). También, se identificaron varios residuos en la periferia (Tyr12 (B), Phe51 (B), Asn32 (B), Leu54 (B), Glu53 (B), Ile10 (B) y Phe28 (B)). Además, el docking entre el constructo 2 y TLR 4 muestra enlaces de hidrógeno (color verde) entre el ligando (color púrpura) Ser30 (A) y los residuos Leu29 (A), Leu26 (A) y Lys34 (A), y un enlace externo con Gly31 (A). También presenta residuos Ser28 (A), Ile32 (A), Ile33 (A), Phe67 (A), Asp63 (A) y Val27 (A) en los extremos (**Figura8B**). Ambas dinámicas moleculares reflejan la mejor posición de interacción entre el receptor y los ligandos. El docking entre el constructo 1 con el TLR 4 (**Figura 8B**) refleja una mayor interacción y por ende es más estable, lo que indica una mayor actividad biológica. Resultado que se refleja en el HADDOCK score y z-score.

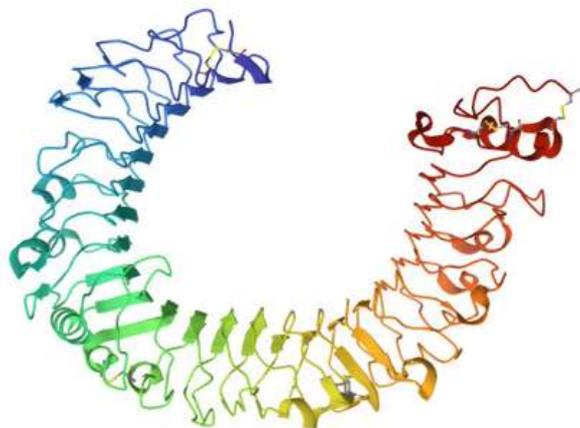
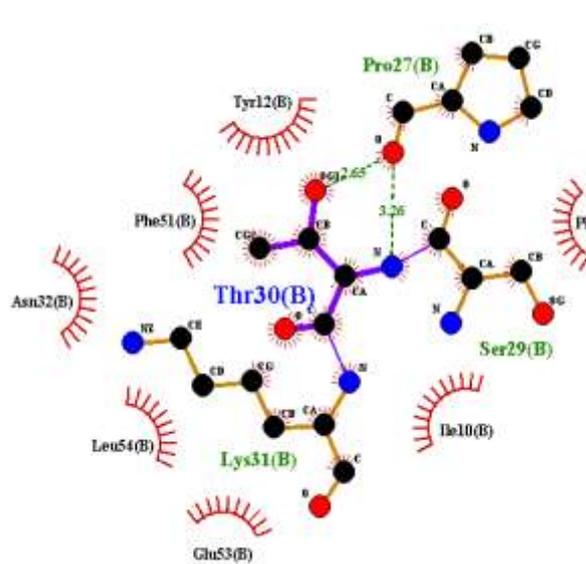


Figura 7: Estructura cristalina del complejo TLR 4 – humano (Accession number PDB: 3FXI_1). Se presenta la cadena A del TLR 4, el cual se emplea para el docking molecular.

A



B

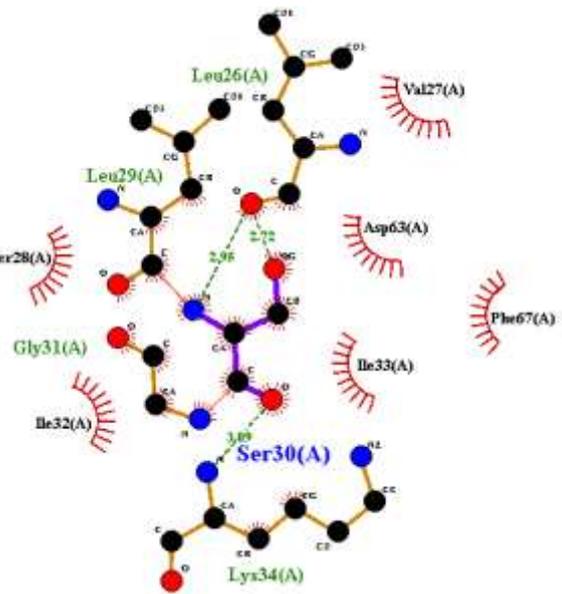


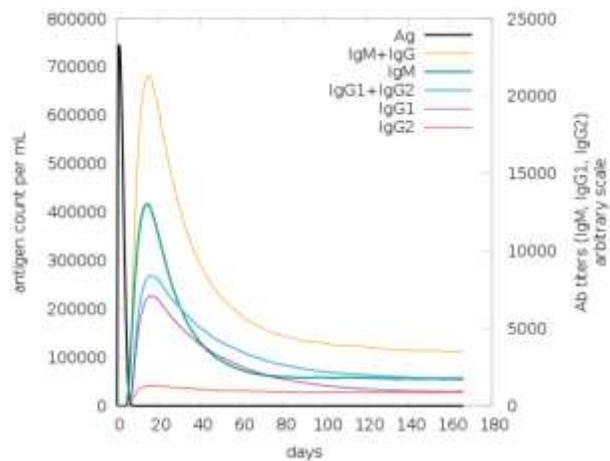
Figura 8: Interacción de la dinámica molecular entre TLR 4 con el constructo 1 (A) y con el constructo 2 (B). Los enlaces de ligando entre el receptor y la vacuna se muestran en color púrpura. Los enlaces de hidrogeno de color verde. Los enlaces con los residuos externos se presentan de color naranja. Los residuos externos se muestran como semicírculos de color rojo.

Simulación inmunológica

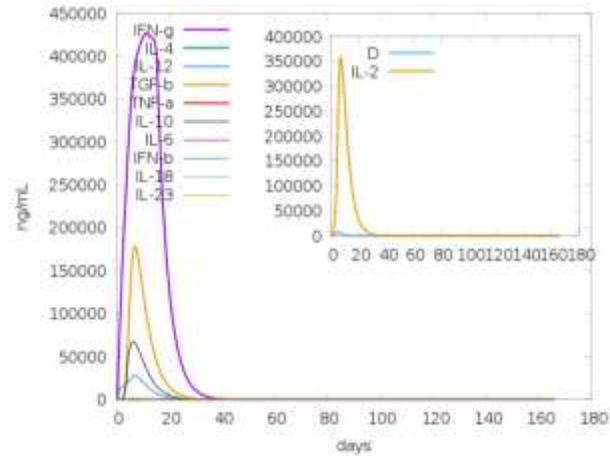
La respuesta inmune *in silico* generada por C-IMMSIM, describe la respuesta inmune de ambos diseños de vacuna. Para el constructo 1 se evaluó con una sola dosis, mientras que para el constructo 2 se evaluó con una dosis duplicada. En ambos casos, se observó una disminución del antígeno y un aumento en los niveles de inmunoglobulinas IgM + IgG, es decir, que se presenta una respuesta de defensa en el huésped (**Figura 9IA** y **Figura 9IB**). A su vez se indujo altos niveles de IFN-g, TGF-b e IL-12 en el constructo 1 (**Figura 9IIA**), caso contrario, el constructo 2 se observó un aumento considerable de IFN-g (**Figura 9IIB**). También se genera un estímulo en el desarrollo de células B y por ende de la respuesta humoral a largo plazo (**Figura 9IIIA**, **IVA** y **IIIB**, **IVB**). Los CTL se presentan como células anérgicas y activas durante un corto periodo de tiempo, tras el cual regresan a un estado de reposo (**Figura 9VA** y **VB**). Los HTL comienzan a duplicarse una vez administrada la vacuna y tienden a estar activas y en reposo en el constructo 1 (**Figura 9VIA**), sin embargo, en el constructo 2 la duplicación después de la administración es menor y también lo es su actividad (**Figura 9VIB**).

En base a la respuesta inmune, la vacuna 1 tiende a generar una mayor actividad, ya que produce IFN-gamma que se da por la respuesta inflamatoria, una mayor activación de células B, y CTL y HTL prolongados, que genera una activación de macrófagos consistente durante el periodo de exposición.

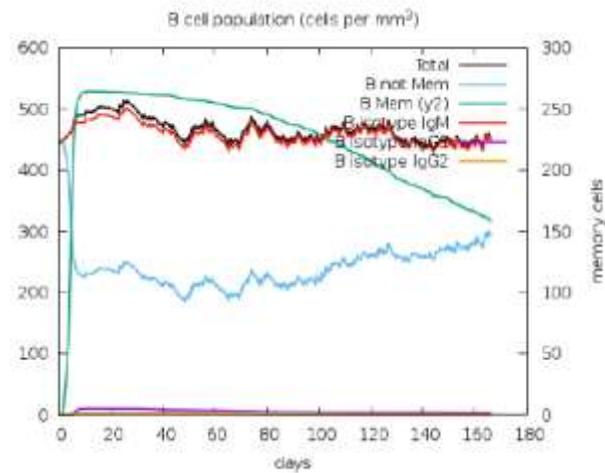
A
I



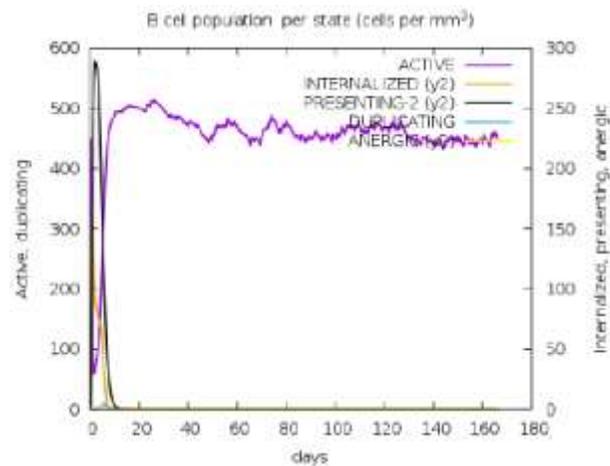
II



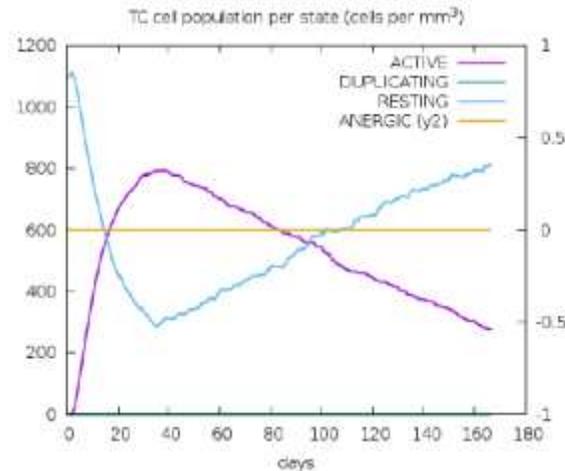
III



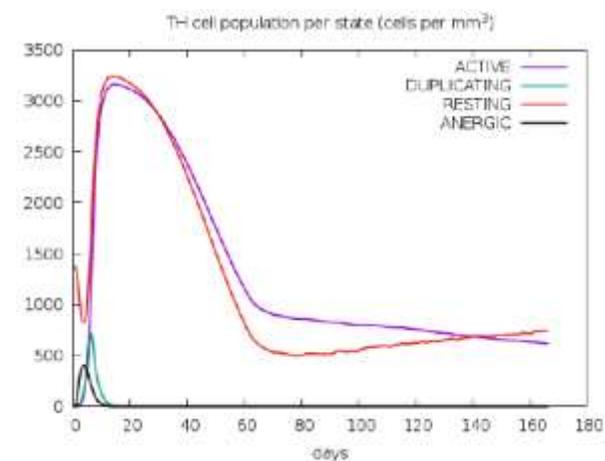
IV



V



VI



B

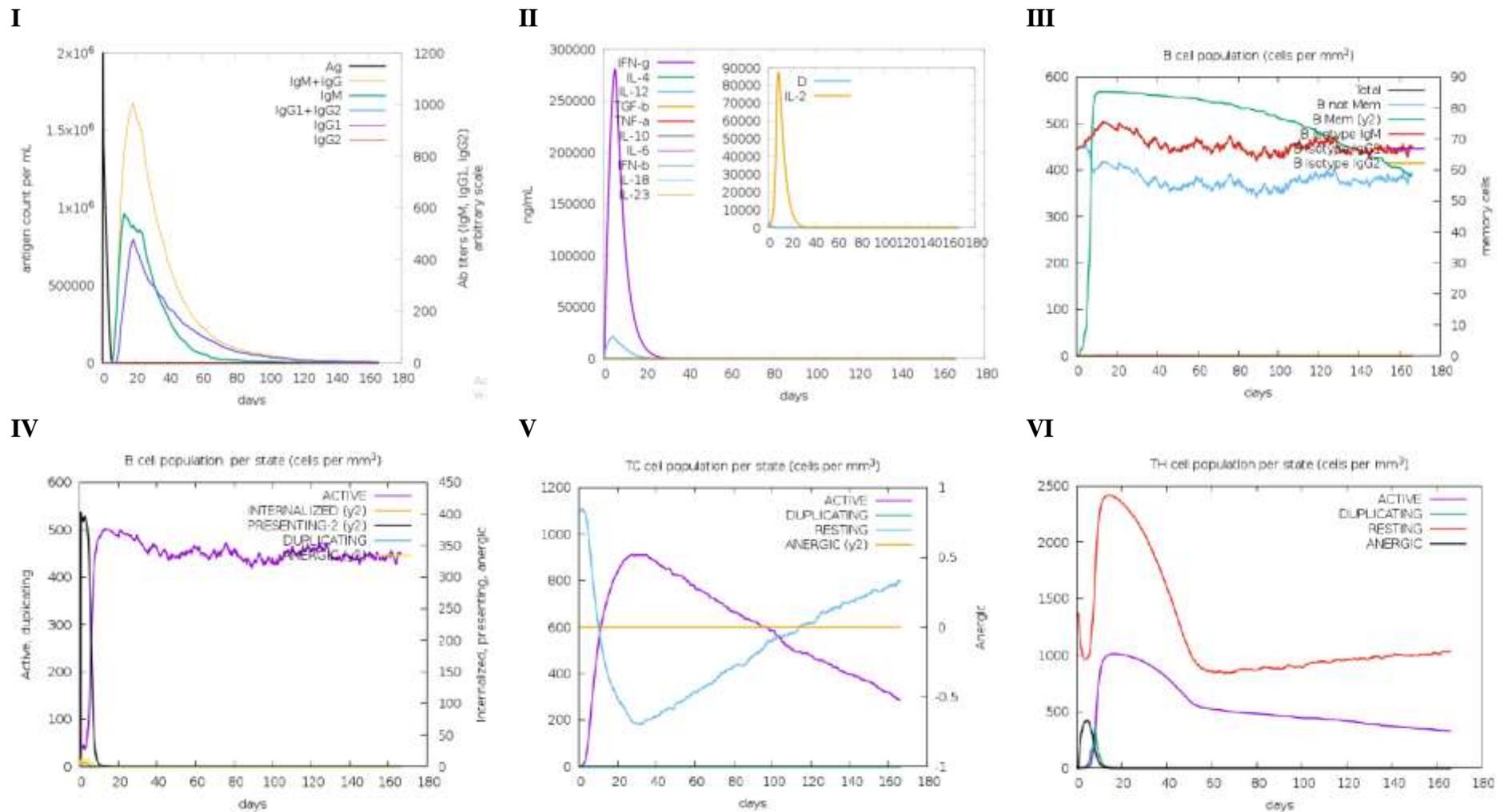


Figura 9: Simulación inmunológica. A del constructo 1 y B del constructo 2. En ambos casos: I. Perfil inmunológico producción de inmunoglobulinas por número de días de respuesta. Se visualiza los niveles de antígeno (negro) e inmunoglobulinas IgM+IgG (amarillo), IgM

(verde), IgG1 (morado). **II.** Concentración de citoquinas e interluquinas. **III** y **IV.** Producción de células B en la población. Producción de células de memoria y su activación. **V.** Producción de células T citotóxicas en diferentes estados de activación a lo largo de los días de la respuesta inmune. **VI.** Producción de células T helper en la población después de administrada la vacuna.

Optimización y clonación

La optimización de codón se realizó mediante VectorBuilder, identificándose en el organismo *Chlamydomonas reinhardtii* para expresar la vacuna multiepítipo. La secuencia de aminoácidos de ambos constructos se convirtió en una secuencia de nucleótidos. El índice CAI del constructo 1 fue de 0.91 y el contenido de GC de 70.18 %. Mientras que el constructo 2 mostró un índice CAI de 0.93 y un contenido de GC igual a 66.74 %. Ambos resultados indican una alta expresión. Se añadieron dos sitios de restricción a cada constructo SacI (GAGCT C) y XhoI (C TCGAG). El diseño de primers, los sitios de restricción y la clonación *in silico* en los plásmidos pGreen 0029 y pGreenII 0179 de los constructos se realizó mediante el programa Benchling. Los primers y la clonación de los constructos se visualizan en la **Figura 10**.

A

Forward

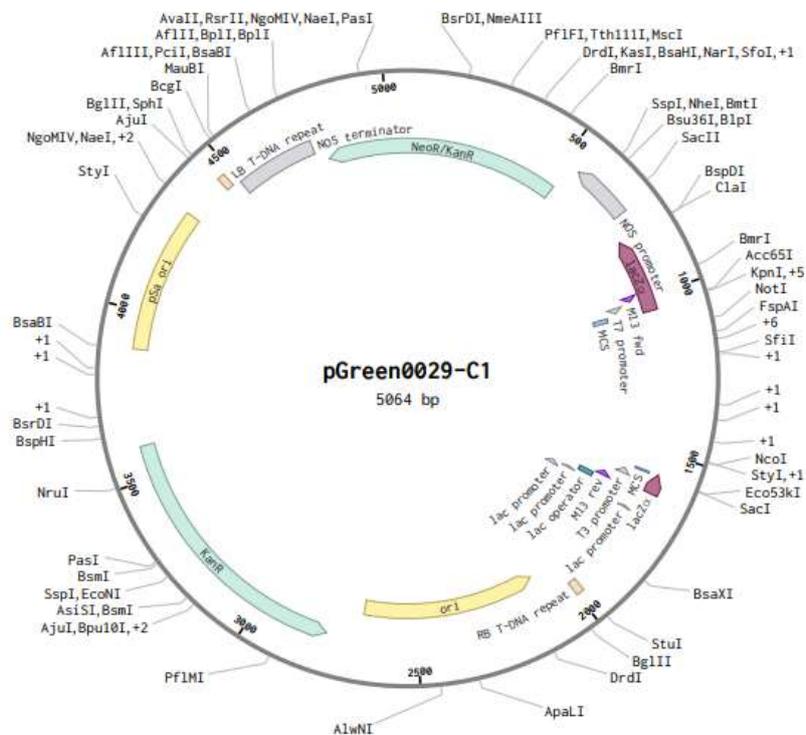
CTCGAGTGCCGCTTCCCACACATC

Reverse

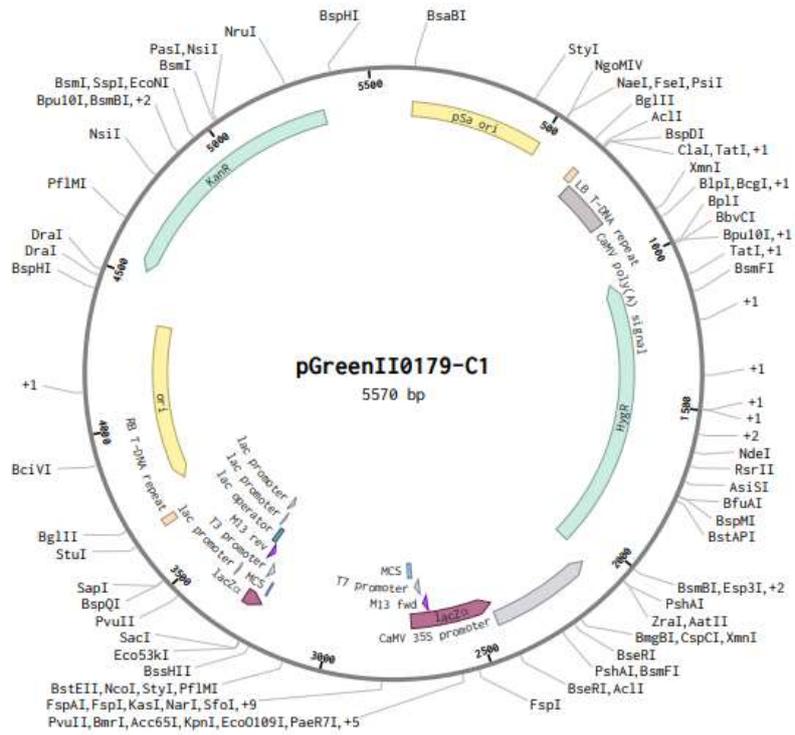
GAGCTCTTACCAGGCGCGGATGCC

B

I



II



C

Forward

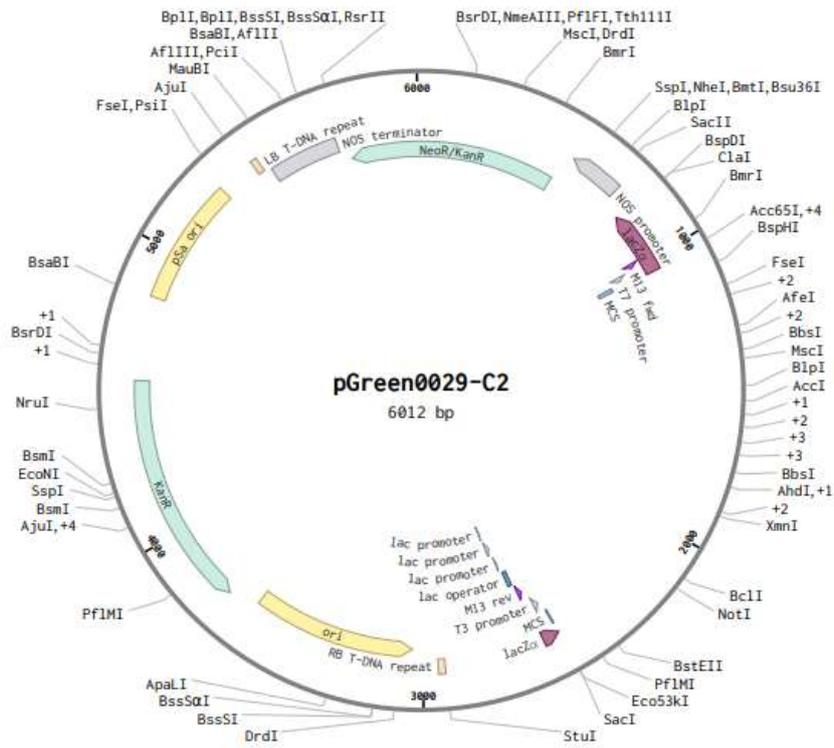
CTCGAGATGCAGCCCTTCGGCGTG

Reverse

GAGCTCTTACCAGGCGCGGATGCC

D

I



II

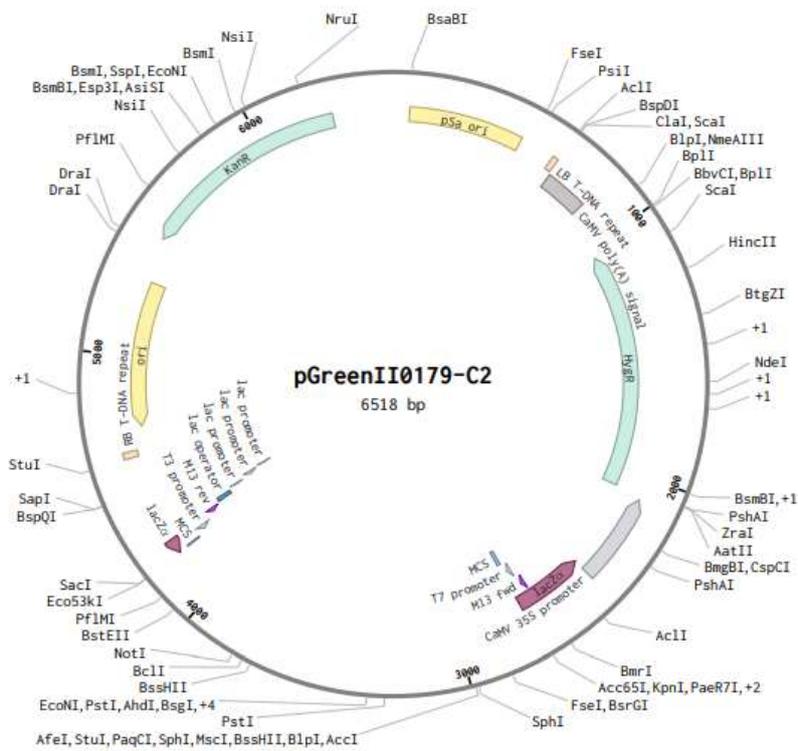


Figura 10: Clonación in silico. **A.** Primers para el constructo 1. **B.** Clonación pGreen 0029 (I) y pGreenII 0179 (II) con el constructo 1. **C.** Primers para el constructo 2. **D.** Clonación pGreen 0029 (I) y pGreenII 0179 (II) con el constructo 2.

Discusión

El género *Salmonella* continúa siendo uno de los mayores causantes de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial. A pesar de los controles en granjas de producción avícola, los brotes de salmonelosis aún persisten. Sumado a ello está la resistencia a los antibióticos, dificultando aún más el control sobre este agente patógeno. Una alternativa ante este problema de brotes, tanto en aves como en humanos, es el uso de vacunas multiepítotos. La vacunación desempeña un rol importante en el proceso de activación del sistema inmune, al encontrarse diseñadas por subunidades derivadas de la proteína causante de la patogenicidad del organismo (Shahab et al., 2022).

Las salmonelas sobreviven y se replican dentro de los macrófagos del huésped, encargados de los mecanismos de defensa. La *fimH* presente en *Salmonella* juega un rol en la adhesión, colonización e invasión bacteriana en el intestino del huésped (Figueroa Ochoa & Verdugo Rodríguez, 2005; Uchiya et al., 2019). Por ello, el diseño de una vacuna multiepítoto a partir de subunidades derivadas de la proteína *fimH*, permitirá inducir una respuesta inmune. El uso de métodos inmunoinformáticos y herramientas bioinformáticas para la predicción de epítotos y análisis fisicoquímicos, proporcionan a las vacunas multiepítotos ventajas sobre las vacunas tradicionales, como una alta especificidad, seguridad, producción y mantenimiento más accesibles (Khan & Kumar, 2021; Lei et al., 2019).

La identificación de los epítotos fue la base del diseño de la vacuna, donde su potencial en el ajuste de la respuesta inmune es a causa de los antígenos peptídicos (Hamley, 2022). Mediante una evaluación *in silico*, se identificaron 7 epítotos adecuados para la vacuna. Los CTL reconocen al antígeno de superficie dado por el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), mientras que los HTL reconocen al antígeno del MHC-II (Oladipo et al., 2020); estos reconocen las células B lineales y discontinuas para generar los anticuerpos y, por ende, una respuesta humoral o celular. Para intensificar las propiedades de la vacuna se requiere de un adyuvante que es capaz de generar una respuesta inmune fuerte por parte de los péptidos (Hamley, 2022; Lei et al., 2019; Sarkar et al., 2019).

El primer diseño de vacuna tiene como adyuvante a la beta defensina 3 (Martinelli, 2022). Con el análisis de antigenicidad y alergenidad, se encontró que la vacuna es no-alérgica y antigénica, por lo tanto, es adecuada para análisis *in silico* e *in vivo*. Sus propiedades físico-químicas indican que es un constructo estable e hidrofílico. La característica

hidrofílica de la vacuna favorece la interacción con moléculas de agua y con los anticuerpos (Z. Chen et al., 2021; Pourseif et al., 2018), mostrando condiciones para generar una respuesta inmune. La segunda vacuna tiene como adyuvante al lipopolisacárido (LPS) (Martinelli, 2022). Igualmente, este constructo es no-alérgico y antigénico. Sin embargo, a diferencia del constructo 1, sus propiedades físico-químicas indican que es estable pero hidrofóbico.

Gran parte de las vacunas multiépítomos poseen la característica de tener como adyuvante a las defensinas por su actividad antibacteriana. Este tipo de péptidos participan en el sistema inmune tanto de vertebrados como de invertebrados, ya que son producidos por células fagocíticas y linfocitos. Además, tienen la capacidad de inducir la producción de citosinas proinflamatorias e inmunorreguladoras. Por ende, estimula una respuesta de inmunidad innata y adaptativa (Lei et al., 2019; Wang et al., 2021). El LPS se deriva de las bacterias Gram-negativas, siendo un fuerte inmunoestimulante y un agonista específico del TLR 4 (Lei et al., 2019; Makwana et al., 2018). Sus propiedades endotóxicas son usadas en el diseño de adyuvantes, por lo que tiende a desencadenar la inmunidad innata al activar el inflamasoma no canónico (Melssen et al., 2019; Pifferi et al., 2021).

Algunos diseños de vacunas contra *Salmonella* emplean los receptores Toll-like TLR 1, TLR 2 y TLR 4 debido a su sensibilidad a las infecciones bacterianas (Beikzadeh, 2023; Zafar et al., 2022). La dinámica molecular de ambos constructos con el TLR 4, indica una interacción estable entre la vacuna y el receptor, mostrando enlaces de hidrógenos fuertes y permitiendo el desarrollo de una respuesta inmune del huésped. Estudios han registrado que *Salmonella* suprime la inmunidad humoral, la linfopoyesis de células B, la expresión de MHC-II, el desarrollo del centro germinal y la supervivencia de las células plasmáticas (Beikzadeh, 2023; Takaya et al., 2020). La respuesta inmune obtenida en la simulación *in silico* muestra la eficacia de ambos constructos al generar una respuesta inmune a largo plazo al presentarse un incremento en las inmunoglobulinas, IFN-gamma, IL-12 y TGF- β . IFN-gamma que se presenta en ambos constructos, activa a los macrófagos y estimula a una mayor secreción de citosinas proinflamatorias, activando a las células NK y regulando la producción de anticuerpos con el fin de modular la respuesta de las células B (Kak et al., 2018). IL-12 junto al IFN-gamma promueven la respuesta inmune de Th 1, el cual tiene el rol de estimular la respuesta inmunológica protectora frente a patógenos invasores (Dar et al., 2019).

La expresión y clonación *in silico* muestra la capacidad de poder expresar ambas vacunas en *Chlorella vulgaris*. Los altos valores en el índice de CAI representan la capacidad de adaptación de las vacunas con el huésped, en este caso la microalga. Este tipo de microalga ha demostrado ser eficiente en la expresión de proteínas recombinantes. Su producción puede darse en gran cantidad y ser económicamente accesible, gracias a su crecimiento autótrofo, donde sólo necesitan luz, minerales, dióxido de carbono y agua (M. J. Kim et al., 2023). La introducción del genoma de vacuna se realiza con diferentes métodos de ingeniería genética como electroporación, perlas de vidrio, etc. Las microalgas que son modificadas para la producción de proteínas antigénicas puede inferir en la producción de células T helpers y células B (Jiji et al., 2023) que junto a la actividad inmunológica de la vacuna facilita una respuesta inmune eficiente en el huésped.

Algunas vacunas contra salmonela se han construido en relación a otros serovares, como por ejemplo la *Salmonella gallinarum* mediante una vacuna pentavalente que genera una respuesta inmune humoral (Hajam et al., 2018). Otro diseño de vacuna, es aquella con proteína recombinante basado en un cassette rLPSI el cual se ordenó en pET28a (+), se clonó en *E.coli* BL21 (DE3) y se expresó utilizando IPTG (1 mM), mostro ser eficaz en el tratamiento con *Salmonella typhimurium* al generar una respuesta antigénica potente. Sin embargo, este resultado se ha testeado en ratones (Aghaie et al., 2023). Adicionalmente, existen vacunas del tipo atenuado que se han usado contra *Salmonella paratifoidea* (Hofacre et al., 2021) o vacunas enfocadas en la delección de secuencias genéticas que confieren la resistencia antibiótica (Curtiss, 2023). Otro diseño de vacuna contra *Salmonella* es la vacuna muerta que se ha adaptado al uso de nanopartículas biodegradables capaz de soportar el pH gastrointestinal (K. Y. Acevedo-Villanueva et al., 2021). Algunos estudios han demostrado que los vectores con *Salmonella* viva atenuada son eficaces en la administración de antígenos o ADN al sistema inmunitario, además de su capacidad de imitar la infección por *Salmonella* induciendo respuestas inmunitarias capaces de resistir las infecciones (Ding et al., 2018). A pesar de eso se ha demostrado que las vacunas multiepítomos generan una respuesta inmunitaria, sin correr riesgos de generar nuevos contagios dentro de las aves. Existen muy pocas vacunas y especialmente de multiepítomos, que se han desarrollado en base a secuencias proteicas participantes en los procesos de patogénesis de la *Salmonella*, y especialmente de *S. typhimurium*.

Zafar et al., (2022) desarrollo una vacuna multiepitopo contra *Salmonella typhimurium* basándose en la proteína Tola. Al igual que con la vacuna diseñada en este estudio, la vacuna multiepitopo basada en Tola, presenta una alta respuesta inmune. La vacuna multiepitopo basada en Tola mostro la formación de inmunoglobulinas IgG1+IgG2, IgM e IgG+IgM, desarrollo de una respuesta celular y una concentración de IFN- y IL-2 favorable. Sin embargo, estos resultados se dan en un periodo corto de tiempo. Al contrario de la vacuna basada en la *fimH* muestra una respuesta de inmunoglobulinas IgG+IgM, una respuesta celular prolongada e IFN-gamma e IL-12 alta, tanto en el constructo 1 como en el constructo 2, durante un periodo de tiempo mucho más duradero y con una sola administración.

Otra diferencia visible del diseño presentado por Zafar et al., (2022) es la presencia del adyuvante LPS, a pesar de que constituye uno de los más usados y tiene relación con las bacterias Gram-negativas, no es usado para construir un prototipo de vacuna. En el constructo 2 de este estudio, el LPS muestra que se puede generar una respuesta inmune, al administrar una dosis elevada. Por ello, realizar una vacuna con este adyuvante y la proteína Tola, nos daría otra visión acerca de cómo controlar los brotes de *Salmonella*. Otra comparación entre ambos estudios, es el medio de expresión. En su estudio usan la bacteria *E. coli* K12, organismo modelo para la mayor cantidad de estudios. Mientras que este trabajo emplea un nuevo mecanismo de expresión y administración a través del uso de microalgas, las cuales en los últimos años han demostrado ser un medio viable y novedoso en el sector del diseño de vacunas.

De igual manera, otro ejemplo pero con *Salmonella enteritidis* es la vacuna viva atenuada basada en las proteínas SpiC y SPI-2 presente en la isla de patogenicidad SPI-2 tipo III de la *Salmonella* a los macrófagos. Estas proteínas tienden a reducir la virulencia de *Salmonella* en ratones y pollos. Dicha vacuna genera una respuesta elevada de IgG, IFN-gamma e IL-6, la cual después de 21 días de inmunización produce una respuesta inmune Th1 y Th2 (Q. Li et al., 2019). En contraste con la vacuna multiepitopo de *Salmonella typhimurium* con Tola y con *fimH*, la respuesta inmune de esta última presenta ser mucho más duradera y a su vez la producción de Th 1.

Conclusión

En conclusión, este estudio demuestra que el desarrollo de una vacuna multiepítipo utilizando herramientas inmunológicas y bioinformáticas, comprenden un mecanismo viable, accesible y de menor tiempo para diseñar vacunas en basadas en las proteínas patogénicas implicadas en los mecanismos de infección de bacterias o virus. *Salmonella entérica subespecie Typhimurium*, es una de las especies causantes de la salmonelosis a nivel mundial, y en los últimos años ha presentado un déficit en su control y tratamiento. Por ello, el diseño de una vacuna específica para *S. Typhimurium* representa una alternativa al uso de antibióticos y un medio más accesible y con una eficiencia inmunológica más duradera.

Las infecciones causadas por *Salmonella* provocan fiebre entérica o diarrea, que usualmente causan la muerte en animales y humanos. La respuesta inmune obtenida en ambos diseños de vacuna muestra resultados favorables, que garantizan la activación de una respuesta inmune humoral y celular, debido a la presencia de células B y células T, así como de anticuerpos después de administrada la vacuna.

Finalmente, la clonación y optimización *in silico* demuestran la viabilidad de la expresión de una vacuna multiepítipo y, por ende, para su producción. Su capacidad para expresarse en la microalga, junto a las ventajas de producción y control de esta especie, implica un medio nuevo y ágil medio para suministrar la vacuna. Es esencial validar estos resultados y, por lo tanto, la eficacia de las vacunas en pruebas *in vivo*, con el objetivo, mejorar el diseño de la vacuna multiepítipo.

Recomendaciones

Los Toll-like comprenden un aspecto fundamental dentro del diseño de la vacuna en la dinámica molecular. Por ello, es esencial evaluar futuros diseños de vacunas con TLR 2 y TLR 3, que se consideren participan en la actividad inmune de las aves.

En el análisis inmunológico *in silico*, es importante analizar una mayor cantidad de dosis y cantidad a administrar, para identificar una respuesta más específica, especialmente en las vacunas que contengan como adyuvante al LPS.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* corresponden una vía importante para el análisis del diseño realizado en este estudio. Con estos estudios se podrá de llevar a la práctica y producción de la vacuna.

Referencias

- Abdi, S. A. H., Ali, A., Sayed, S. F., Abutahir, Ali, A., & Alam, P. (2022). Multi-Epitope-Based Vaccine Candidate for Monkeypox: An In Silico Approach. *Vaccines*, *10*(9), 1564. <https://doi.org/10.3390/VACCINES10091564/S1>
- Acevedo-Villanueva, K., Renu, S., Gourapura, R., & Selvaraj, R. (2021). Efficacy of a nanoparticle vaccine administered in-ovo against Salmonella in broilers. *PLOS ONE*, *16*(4), e0247938. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0247938>
- Acevedo-Villanueva, K. Y., Akerele, G. O., Hakeem, W. G. Al, Renu, S., Shanmugasundaram, R., & Selvaraj, R. K. (2021). A Novel Approach against Salmonella: A Review of Polymeric Nanoparticle Vaccines for Broilers and Layers. *Vaccines 2021, Vol. 9, Page 1041*, *9*(9), 1041. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9091041>
- Adam, K. M. (2021). Immunoinformatics approach for multi-epitope vaccine design against structural proteins and ORF1a polyprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S40794-021-00147-1/FIGURES/7>
- Aghaie, S. M., Tabatabaei, M., & Nazarian, S. (2023). Bioinformatics design of recombinant chimeric protein containing SipD and LptD immunogens and evaluation of its immunogenicity against Salmonella Typhimurium. *Microbial Pathogenesis*, *175*, 105959. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105959>
- Akil, L., & Ahmad, H. A. (2019). Quantitative Risk Assessment Model of Human Salmonellosis Resulting from Consumption of Broiler Chicken. *Diseases*, *7*(1), 19. <https://doi.org/10.3390/DISEASES7010019>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2015). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2015.12.004>

- Baliban, S. M., Lu, Y. J., & Malley, R. (2020). Overview of the Nontyphoidal and Paratyphoidal Salmonella Vaccine Pipeline: Current Status and Future Prospects. *Clinical Infectious Diseases*, *71*(Supplement_2), S151–S154. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA514>
- Bearson, S. M. D. (2022). Salmonella in Swine: Prevalence, Multidrug Resistance, and Vaccination Strategies. *Annual Review of Animal Biosciences*, *10*(Volume 10, 2022), 373–393. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ANIMAL-013120-043304/1>
- Beikzadeh, B. (2023). Immunoinformatics design of multi-epitope vaccine using OmpA, OmpD and enterotoxin against non-typhoidal salmonellosis. *BMC Bioinformatics*, *24*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12859-023-05183-6/FIGURES/7>
- Castro-Vargas, R. E., Herrera-Sánchez, M. P., Rodríguez-Hernández, R., & Rondón-Barragán, I. S. (2020). Antibiotic resistance in Salmonella spp. isolated from poultry: A global overview. *Veterinary World*, *13*(10), 2070. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2020.2070-2084>
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *66*(1), 12–21.
- Chen, Z., Zhu, Y., Sha, T., Li, Z., Li, Y., Zhang, F., & Ding, J. (2021). Design of a new multi-epitope vaccine against Brucella based on T and B cell epitopes using bioinformatics methods. *Epidemiology & Infection*, *149*, e136. <https://doi.org/10.1017/S0950268821001229>
- Clark-Curtiss, J. E., & Curtiss, R. (2018). Salmonella Vaccines: Conduits for Protective Antigens. *The Journal of Immunology*, *200*(1), 39–48. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1600608>
- Curtiss, R. (2023). Vaccines to Control Salmonella in Poultry. *Avian Diseases*, *67*(4), 427–440. <https://doi.org/10.1637/AVIANDISEASES-D-23-99988>
- Dar, M. A., Urwat, U., Ahmad, S. M., Ahmad, R., Kashoo, Z. A., Dar, T. A., Bhat, S. A., Mumtaz, P. T., Shabir, N., Shah, R. A., & Heidari, M. (2019). Gene expression and

- antibody response in chicken against *Salmonella* Typhimurium challenge. *Poultry Science*, 98(5), 2008–2013. <https://doi.org/10.3382/PS/PEY560>
- Davies, K. (2020). From the bench to benchling. *GEN Edge*, 2(1), 303–309.
- De Vries, S. J., Van Dijk, M., & Bonvin, A. M. J. J. (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature Protocols* 2010 5:5, 5(5), 883–897. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.32>
- Dhanda, S. K., Vir, P., & Raghava, G. P. S. (2013). Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biology Direct*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-30/TABLES/9>
- Ding, K., Shang, K., Yu, Z. H., Yu, C., Jia, Y. Y., He, L., Liao, C. S., Li, J., Zhang, C. J., Li, Y. J., Wu, T. C., & Cheng, X. C. (2018). Recombinant-attenuated *Salmonella* Pullorum strain expressing the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against NDV and *Salmonella* Pullorum challenge. *Journal of Veterinary Science*, 19(2), 232–241. <https://doi.org/10.4142/JVS.2018.19.2.232>
- Djeffal, S., Mamache, B., Elgroud, R., Hireche, S., & Bouaziz, O. (2018). Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. contamination in broiler chicken farms and slaughterhouses in the northeast of Algeria. *Veterinary World*, 11(8), 1102. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2018.1102-1108>
- Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4/TABLES/2>
- Du, Z., Su, H., Wang, W., Ye, L., Wei, H., Peng, Z., Anishchenko, I., Baker, D., & Yang, J. (2021). The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nature Protocol*, 16(12), 5634–5651. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9>
- El-Sharkawy, H., Tahoun, A., El-Gohary, A. E. G. A., El-Abasy, M., El-Khayat, F., Gillespie, T., Kitade, Y., Hafez, H. M., Neubauer, H., & El-Adawy, H. (2017). Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms in Egypt. *Gut Pathogens*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13099-017-0157-1/TABLES/6>

- Fatoba, A. J., Adeleke, V. T., Maharaj, L., Okpeku, M., Adeniyi, A. A., & Adeleke, M. A. (2022). Design of a Multiepitope Vaccine against Chicken Anemia Virus Disease. *Viruses*, 14(7), 1456. <https://doi.org/10.3390/V14071456/S1>
- Ferdous, S., Kelm, S., Baker, T. S., Shi, J., & Martin, A. C. R. (2019). B-cell epitopes: Discontinuity and conformational analysis. *Molecular Immunology*, 114, 643–650. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2019.09.014>
- Fernández-Prada, M., López Trigo, J. A., Bayas, J. M., & Cambronero, M. del R. (2020). Quo vadis en vacunas: desde la aproximación empírica a la nueva oleada tecnológica. *Revista Española de Geriatría y Gerontología*, 55(3), 160–168. <https://doi.org/10.1016/J.REGG.2019.09.001>
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K. A., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. S., & Conte-Juniora, C. A. (2019). Worldwide epidemiology of Salmonella serovars in animal-based foods: A meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14). https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19/SUPPL_FILE/AEM.00591-19-S0001.PDF
- Figuroa Ochoa, I. M., & Verdugo Rodríguez, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella spp. *Revista Lationamericana de Microbiología*, 47(1–2), 25–42.
- Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S. K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., & Sette, A. (2017). The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 250318. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00278/BIBTEX>
- Gadamchetty, P., Mullapudi, P. L. V., Sanagala, R., Markandan, M., & Polumetla, A. K. (2019). Genetic transformation of Chlorella vulgaris mediated by HIV-TAT peptide. *3 Biotech*, 9(4), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S13205-019-1671-2/METRICS>
- Galanis, K. A., Nastou, K. C., Papandreou, N. C., Petichakis, G. N., Pigis, D. G., & Iconomidou, V. A. (2021). Linear B-Cell Epitope Prediction for In Silico Vaccine Design: A Performance Review of Methods Available via Command-Line Interface. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3210, 22(6), 3210. <https://doi.org/10.3390/IJMS22063210>

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG563>
- Global Food Safety International. (2024, April). *Retiros de alimentos del mercado de los Estados Unidos durante el primer trimestre de 2024*.
- Gunasekaran, B., & Gothandam, K. M. (2020). A review on edible vaccines and their prospects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *53*(2), e8749. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198749>
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., & Raghava, G. P. S. (2013). In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLOS ONE*, *8*(9), e73957. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073957>
- Hajam, I. A., Kim, J., & Lee, J. H. (2018). Salmonella Gallinarum delivering M2eCD40L in protein and DNA formats acts as a bivalent vaccine against fowl typhoid and H9N2 infection in chickens. *Veterinary Research*, *49*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13567-018-0593-Z/TABLES/2>
- Hamley, I. W. (2022). Peptides for Vaccine Development. *ACS Applied Bio Materials*, *5*(3), 905–944. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01238>
- Hofacre, C. L., Rosales, A. G., Costa, M. Da, Cookson, K., Schaeffer, J., & Jones, M. K. (2021). Immunity and Protection Provided by Live Modified Vaccines Against Paratyphoid Salmonella in Poultry—An Applied Perspective. *Avian Diseases*, *65*(2), 295–302. <https://doi.org/10.1637/AVIANDISEASES-D-20-00126>
- Jajere, S. M. (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, *12*(4), 504. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2019.504-521>
- Jespersen, M. C., Mahajan, S., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2019). Antibody specific B-cell epitope predictions: Leveraging information from antibody-antigen protein complexes. *Frontiers in Immunology*, *10*(FEB), 434287. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00298/BIBTEX>

- Jiji, M. G., Ninan, M. A., Thomas, V. P., & Thomas, B. T. (2023). Edible microalgae: potential candidate for developing edible vaccines. *Vegetos*, 1–6. <https://doi.org/10.1007/S42535-023-00636-Y/TABLES/1>
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 64–79. https://doi.org/10.1515/BMC-2018-0007/ASSET/GRAPHIC/J_BMC-2018-0007_FIG_002.JPG
- Khan, F., & Kumar, A. (2021). Vaccine Design and Immunoinformatics. *Advances in Bioinformatics*, 137–149. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6191-1_8
- Kim, M.-J. ;, Kim, S.-H. ;, Kim, J.-O. ;, Lee, T.-K. ;, Jang, I.-K. ;, Choi, T.-J., Kim, M.-J., Kim, S.-H., Kim, J.-O., Lee, T.-K., Jang, I.-K., & Choi, T.-J. (2023). Efficacy of White Spot Syndrome Virus Protein VP28-Expressing *Chlorella vulgaris* as an Oral Vaccine for Shrimp. *Viruses* 2023, Vol. 15, Page 2010, 15(10), 2010. <https://doi.org/10.3390/V15102010>
- Kim, M. J., Kim, S. H., Kim, Y. R., & Choi, T. J. (2023). Enhancement of *Chlorella* transformation efficacy by insert fragmentation. *Algal Research*, 72, 103146. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103146>
- Kisiela, D., Kuczkowski, M., Kiczak, L., Wieliczko, A., & Ugorski, M. (2005). Differentiation of *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* from *Salmonella Gallinarum* biovar *Pullorum* by PCR-RFLP of the *fimH* gene. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52(5), 214–218. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.2005.00846.X>
- Kumar, D., Pornsukarom, S., & Thakur, S. (2019). Antibiotic Usage in Poultry Production and Antimicrobial-Resistant *Salmonella* in Poultry. *Food Safety in Poultry Meat Production*, 47–66. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05011-5_3
- Kumar, Y., Singh, V., Kumar, G., Gupta, N., & Tahlan, A. (2019). Serovar diversity of *Salmonella* among poultry. *Indian Journal of Medical Research*, 150(1), 92–95. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_1798_17
- Larsen, M. V., Lundegaard, C., Lamberth, K., Buus, S., Lund, O., & Nielsen, M. (2007). Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC*

Bioinformatics, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-424/TABLES/3>

- Lei, Y., Zhao, F., Shao, J., Li, Y., Li, S., Chang, H., & Zhang, Y. (2019). Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. *PeerJ*, 6, e6185. <https://doi.org/10.7717/peerj.6185>
- Li, J., Qiu, J., Huang, Z., Liu, T., Pan, J., Zhang, Q., & Liu, Q. (2021). Reverse vaccinology approach for the identifications of potential vaccine candidates against *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 311(5), 151508. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2021.151508>
- Li, Q., Zhu, Y., Ren, J., Qiao, Z., Yin, C., Xian, H., Yuan, Y., Geng, S., & Jiao, X. (2019). Evaluation of the Safety and Protection Efficacy of *spiC* and *nmpC* or *rfaL* Deletion Mutants of *Salmonella* Enteritidis as Live Vaccine Candidates for Poultry Non-Typhoidal Salmonellosis. *Vaccines* 2019, Vol. 7, Page 202, 7(4), 202. <https://doi.org/10.3390/VACCINES7040202>
- Lund, O., Nielsen, M., Kesmir, C., Petersen, A. G., Lundegaard, C., Worning, P., Sylvester-Hvid, C., Lamberth, K., Røder, G., Justesen, S., Buus, S., & Brunak, S. (2004). Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices. *Immunogenetics*, 55(12), 797–810. <https://doi.org/10.1007/S00251-004-0647-4/METRICS>
- Makwana, P., Kalyani, I., Desai, D., Patel, D., Sakhare, P., & Muglikar, D. (2018). Role of Adjuvants in Vaccine Preparation: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(11), 972–988. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.711.113>
- Martinelli, D. D. (2022). In silico vaccine design: A tutorial in immunoinformatics. *Healthcare Analytics*, 2, 100044. <https://doi.org/10.1016/J.HEALTH.2022.100044>
- Martínez, R. (2024, April). *Francia alerta de la detección de salmonela en productos de pollo procedentes de España*.
- Melssen, M. M., Petroni, G. R., Chianese-Bullock, K. A., Wages, N. A., Grosh, W. W., Varhegyi, N., Smolkin, M. E., Smith, K. T., Galeassi, N. V., Deacon, D. H., Gaughan, E. M., & Slingluff, C. L. (2019). A multipeptide vaccine plus toll-like receptor agonists LPS

or polyICLC in combination with incomplete Freund's adjuvant in melanoma patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S40425-019-0625-X/FIGURES/4>

- Mridha, D., Uddin, M. N., Alam, B., Akhter, A. H. M. T., Islam, S. K. S., Islam, M. S., Khan, M. S. R., & Kabir, S. M. L. (2020). Identification and characterization of Salmonella spp. from samples of broiler farms in selected districts of Bangladesh. *Veterinary World*, 13(2), 275. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2020.275-283>
- Nair, D. V. T., & Kollanoor Johny, A. (2019). Salmonella in Poultry Meat Production. *Food Safety in Poultry Meat Production*, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05011-5_1
- Negahdaripour, M., Nezafat, N., Eslami, M., Ghoshoon, M. B., Shoolian, E., Najafipour, S., Morowvat, M. H., Dehshahri, A., Erfani, N., & Ghasemi, Y. (2018). Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine. *Infection, Genetics and Evolution*, 58, 96–109. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2017.12.008>
- Nielsen, M., Lund, O., Buus, S., & Lundegaard, C. (2010). MHC Class II epitope predictive algorithms. *Immunology*, 130(3), 319–328. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2010.03268.X>
- Oladipo, E. K., Ajayi, A. F., Ariyo, O. E., Onile, S. O., Jimah, E. M., Ezediuno, L. O., Adebayo, O. I., Adebayo, E. T., Odeyemi, A. N., Oyeleke, M. O., Oyewole, M. P., Oguntomi, A. S., Akindiya, O. E., Olamoyegun, B. O., Aremu, V. O., Arowosaye, A. O., Aboderin, D. O., Bello, H. B., Senbadejo, T. Y., ... Oloke, J. K. (2020). Exploration of surface glycoprotein to design multi-epitope vaccine for the prevention of Covid-19. *Informatics in Medicine Unlocked*, 21, 100438. <https://doi.org/10.1016/J.IMU.2020.100438>
- Parisi, A., Crump, J. A., Glass, K., Howden, B. P., Furuya-Kanamori, L., Vilkins, S., Gray, D. J., & Kirk, M. D. (2018). Health Outcomes from Multidrug-Resistant Salmonella Infections in High-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(7), 428–436. <https://doi.org/10.1089/FPD.2017.2403>
- Parvizpour, S., Pourseif, M. M., Razmara, J., Rafi, M. A., & Omidi, Y. (2020). Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. *Drug Discovery Today*, 25(6), 1034–1042. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2020.03.006>

- Phongaran, D., Khang-Air, S., & Angkittrakul, S. (2019). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broilers and pigs in Thailand. *Veterinary World*, *12*(8), 1311. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2019.1311-1318>
- Pifferi, C., Fuentes, R., & Fernández-Tejada, A. (2021). Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nature Reviews Chemistry* *2021* *5*:3, *5*(3), 197–216. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-00244-3>
- Popa, G. L., & Popa, M. I. (2021). *Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs*, *11*(1), 88. <https://doi.org/10.18683/GERMS.2021.1244>
- Pourseif, M. M., Moghaddam, G., Daghighkia, H., Nematollahi, A., & Omid, Y. (2018). A novel B- and helper T-cell epitopes-based prophylactic vaccine against *Echinococcus granulosus*. *BioImpacts : BI*, *8*(1), 39. <https://doi.org/10.15171/BI.2018.06>
- Ramírez Cando, L. J., Chicaiza Ramírez, S. E., Ramos López, A. D., & Álvarez, C. I. (2019). Detection of betalactamic antibiotics, tetracyclines and sulfamides as emerging pollutants in the rivers San Pedro and Pita of the Canton Rumiñahui. *La Granja*, *30*(2), 80–93. <https://doi.org/10.17163/lgr.n30.2019.08>
- Ramos-Vega, A., Angulo, C., Bañuelos-Hernández, B., & Monreal-Escalante, E. (2021). Microalgae-made vaccines against infectious diseases. *Algal Research*, *58*, 102408. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102408>
- Rani, S., Alam, K. J., Saha, S. S., Rahman, M. M., & Alam, M. S. (2022). Seroprevalence, Identification, and Pathology of Salmonellosis in Selected Poultry Farms at Barishal District of Bangladesh. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, *10*(6), 1158–1164. <https://doi.org/10.24925/TURJAF.V10I6.1158-1164.4980>
- Rapin, N., Lund, O., & Castiglione, F. (2011). Immune system simulation online. *Bioinformatics*, *27*(14), 2013–2014. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR335>
- Redweik, G. A. J., Stromberg, Z. R., Van Goor, A., & Mellata, M. (2020). Protection against avian pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Kentucky exhibited in chickens given both probiotics and live *Salmonella* vaccine. *Poultry Science*, *99*(2), 752–762. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2019.10.038>

- Sarkar, I., Garg, R., & van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2019). Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. *Expert Review of Vaccines*, 18(5), 505–521. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1604231>
- Sen, P., Waris, A., Ray, S. K., & Satapathy, S. S. (2020). A Web Portal to Calculate Codon Adaptation Index (CAI) with Organism Specific Reference Set of High Expression Genes for Diverse Bacteria Species. *Algorithms for Intelligent Systems*, 319–325. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0633-8_31
- Shahab, M., Hayat, C., Sikandar, R., Zheng, G., & Akter, S. (2022). In silico designing of a multi-epitope vaccine against Burkholderia pseudomallei: reverse vaccinology and immunoinformatics. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 100. <https://doi.org/10.1186/S43141-022-00379-4>
- Sharma, N., Patiyal, S., Dhall, A., Pande, A., Arora, C., & Raghava, G. P. S. (2021). AlgPred 2.0: an improved method for predicting allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Briefings in Bioinformatics*, 22(4), 1–12. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBAA294>
- Sobolev, O. V, Afonine, P. V, Moriarty, N. W., Hekkelman, M. L., Joosten, R. P., Perrakis, A., & Adams, P. D. (2020). A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. *CellPress*, 1249–1258. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.08.005>
- Takaya, A., Yamamoto, T., & Tokoyoda, K. (2020). Humoral Immunity vs. Salmonella. *Frontiers in Immunology*, 10, 507382. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.03155/BIBTEX>
- Tregaskes, C. A., & Kaufman, J. (2021). Chickens as a simple system for scientific discovery: The example of the MHC. *Molecular Immunology*, 135, 12–20. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2021.03.019>
- Uchiya, K. I., Kamimura, Y., Jusakon, A., & Nikai, T. (2019). Salmonella fimbrial protein FimH is involved in expression of proinflammatory cytokines in a Toll-like receptor 4-dependent manner. *Infection and Immunity*, 87(3). https://doi.org/10.1128/IAI.00881-18/SUPPL_FILE/IAI.00881-18-S0001.PDF
- van Zundert, G. C. P., & Bonvin, A. M. J. J. (2014). Modeling Protein–Protein Complexes

- Using the HADDOCK Webserver “Modeling Protein Complexes with HADDOCK.” *Methods in Molecular Biology*, 1137, 163–179. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0366-5_12
- Velhner, M., Milanov, D., & Kozoderovic, G. (2018). Salmonella spp. in poultry: a constant challenge and new insights. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(2), 899–910. <https://doi.org/10.12681/jhvms.18012>
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(2), 127–134. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/8.2.127>
- Wang, T., Wang, Z., Mi, J., Wang, W., Li, K., Qi, X., Gao, Y., Gao, L., Liu, C., Zhang, Y., Pan, Q., Wang, X., & Cui, H. (2021). Recombinant Avian β -Defensin Produced by Food-Grade Lactococcus as a Novel and Potent Immunological Enhancer Adjuvant for Avian Vaccine. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(6), 1833–1846. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09847-8/FIGURES/8>
- Wessels, K., Rip, D., & Gouws, P. (2021). Salmonella in Chicken Meat: Consumption, Outbreaks, Characteristics, Current Control Methods and the Potential of Bacteriophage Use. *Foods*, 10(8), 1742. <https://doi.org/10.3390/FOODS10081742>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W407. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM290>
- Wonderlich, J., Shearer, G., Livingstone, A., Brooks, A., Soloski, M. J., & Presby, M. M. (2018). Induction and Measurement of Cytotoxic T Lymphocyte Activity. *Current Protocols in Immunology*, 120(1), 3.11.1-3.11.29. <https://doi.org/10.1002/CPIM.38>
- World Health Organization. (2024). *Immunization, Vaccines and Biologicals*. <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/nontyphoidal-salmonella-disease>
- Yadav, G., & Sen, R. (2017). Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: Recent technological advances in climate research. *Journal of CO2 Utilization*, 17, 188–206.

<https://doi.org/10.1016/J.JCOU.2016.12.006>

Yurina, V., & Adianingsih, O. R. (2022). Predicting epitopes for vaccine development using bioinformatics tools. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, *10*, 1–12. <https://doi.org/10.1177/25151355221100218>

Zafar, S., Ajab, H., Mughal, Z. un nisa, Ahmed zai, J., Baig, S., Baig, A., Habib, Z., Jamil, F., Ibrahim, M., Kanwal, S., & Asif Rasheed, M. (2022). Prediction and evaluation of multi epitope based sub-unit vaccine against *Salmonella typhimurium*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(2), 1092–1099. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.09.061>

Zheng, B., Zhang, J., Chen, H., Nie, H., Miller, H., Gong, Q., & Liu, C. (2020). T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, *11*, 500614. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00061/BIBTEX>

Anexos

Anexo 1: Secuencia fasta de la proteína fimH.

>AAA75420.1 FimH [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium]

MKIYSALLLAGTALFFTHPALATVCRNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNNQPGQVVTLPEKSAWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSELPVQSTEGNFKYLKLNDYLLGAMSITDSVAGVSYPPRNYILMGVDYNSVQKQKPFQVQDSKLVFKLVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISYSGKVEVPQNCVNAAGQVVEFDGDFGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNVAAQAYLSMRLEAEKASGQAMVSDNPD LGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTGIKPAEGPFTARGYL RVDYD

Anexo 2: Secuencia fasta del TLR 4.

>3FXI_1|Chains A, B|Toll-like receptor 4|Homo sapiens (9606)

EPCVEVVPNITYQCMELNFYKIPDNLPFSTKNLDLSFNPLRHLGYSFFSFPELQVLDL SRCEIQTIEDGAYQSLSHLSTLILGTGNPIQSLALGAFSGLSSLQKLVAVETNLASLENFPIGHLKTLKELNVAHNLIQSFKLPEYFSNLTNLEHLDLSSNKIQSIYCTDLRVLHQMPLLNLSLDLSLNP MNFIQPGAFKEIRLHKLTLRNNFDSLNV MKTCIQGLAGLEVHRLVLG EFRNEGNLEKFDKSALEGLCNLTIEEFRLAYLDY YLDDIIDLFNCLTNVSSFSLVSVTI ERVKDFSYNFGWQHLELVNCKFGQFPTLKLKSLKRLTFTSNKGGNAFSEVDLPSLEFLDLSRNGLSFKGCCS QSDFGTTSLKYLDLSFNGVITMSSNFLGLEQLEHLDFQHSNLK QMSEFSVFLSLRNLIYLDISHHTRVAFNGIFNGLSSLEVLK MAGNSFQENFLPDIFTE LRNLTFDLDSQCQLEQLSPTAFNSLSSLQVLNMSHNNFFSLDTFPYKCLNSLQVLDYS LN HIMTSKKQELQHFPSSLAFLNLTQNDFACTCEHQSF LQWIKDQRQLLVEVERMEC ATPSDKQGMPVLSL NITCQMNK

Anexo 3: Secuencia optimizada de los constructos 1 y 2. Obtenida del programa VectorBuilder.

Constructo 1

TGCCGCTTCCCACACATCGCCATCGGCAAGTGCGCTACCTTCATCTCGTGC TGCGGCCGCGCCTACGAGGTGGACGCGCTGAACTCGGTGCGCACCTCGCCCTGG CTGCTGGCGCCCGGCAACAACCCCCACGAGGCGGCCGCGAAGGCCGCGCGCGTGGGCATCCGCGCCTGGGCCGCTACATCCTGATGGGCGTGGACTACAACGTGGGC

CCGGGCCCCGGGCAACTTCAAGTATCTGAAGCTGAACGACTACCTGCTGGGCGCT
ATGGGCCCCGGGCCCCGGGCCCCCCCCCGCAACTACATCCTGATGGGCGTGGACTAC
AACGTGTCCGGCCCCGGCCCCGGCTTCAAGCTGAAGGTGATCCGCCCCCTTCATTA
ACATGGTGACCATCGGCCCCGGCCCCGGGCCGCCTGGAGGCGGAGAAGGCTTCGG
GCCAGGCCATGGTGTCTGGATGGCCCCGGCCCCGGCCACCTGGACGACAACGCCG
CTGCGCGCGTGGGCATCCGCGCCTGGTAA

Constructo 2

ATGCAGCCCTTCGGCGTGCTGGACCGCTACATCGGCAAGACCATCTTCAC
CACCATCATGATGACCCTGTTCATGCTGGTGAGCCTGTCCGGCATCATCAAGTTC
GTGGACCAGCTGAAGAAGGCCGGCCAGGGCAACTACGATGCCCTGGGCGCGGGC
ATGTACACCCTGCTGTCCGTGCCAAGGACATCCAGATTTTCTTCCCCATGGCGG
CCCTGCTGGGCGCCCTGCTGGGCCTGGGCATGCTGGCGCAGCGCTCCGAGCTGGT
CGTGATGCAGGCCTCGGGCTTCACCCGCATGCAGGTGGCTCTGAGCGTGATGAA
GACGGCGATCCCCCTGGTGCTGCTGACCATGGCCATCGGCGAGTGGGTGGCCCC
CCAGGGCGAGCAGATGGCCCCGCAACTACCGCGCGCAGGCCATGTACGGCGGCTC
CCTGCTGAGCACCAGCAGGGCCTGTGGGCCAAGGACGGCAACAACCTTCGTCTA
CATCGAGCGCGTGAAGGGCGACGAGGAGCTTGCCGGCATTTCGATCTACGCCTTC
AACGACCAGCGCCGCCTGCAGAGCGTGCGCTACGCTGCCTCCGCCAAGTTCGAC
CCCGAGCACAAGGTGTGGCGCCTGAGCCAGGTGGACGAGAGCGACCTGCAGAAC
CCCAAGCAGATCACCGGCTCGCAGACCGTGTCTGGGCACCTGGAAGACCAACCTG
ACGCCGGACAAGCTGGGCGTGGTGGCACTGGACCCCCGACGCACTGTCGATCAGC
GGCCTGCACAACCTACGTGAAGTACCTGAAGAGCAGCGGCCAGGACGCGGGCCGC
TACCAGCTGAACATGTGGTTCGAAGATCTTCCAGCCCCCTGTCCGTGGCCGTGATGA
TGCTGATGGCCCTGTCCTTCATCTTCGGCCCCCTGCGCAGCGTGCCCATGGGCGT
GCGCGTGGTGACGGGCATCTCCTTCGGCTTTGTGTTCTACGTGCTGGACCAGATC
TTCGGCCCCCTGACCCTGGTGTACGGCATCCCGCCCATCGTGGGCGCGCTGCTGC
CGTCGGCCTCGTTCTTCCTGATCAGCCTGTGGCTGATGCTGCGCAAGTCGGAGGC
GGCCGCCAAGGCGGCCCGCGTGGGCATCCGGGCCTGGGCAGCCTACATCCTGAT
GGGCGTGGACTACAACGTGGGCCCCGGCCCCGGGCAACTTCAAGTACCTGAAGCT
GAACGACTACCTGCTGGGCGCCATGGGCCCCGGCCCCGGGCCCCGCCGCGCAACTA
CATCCTGATGGGCGTGGACTACAACGTGAGCGGCCCGGCCCGGGCTTCAAGCT
GAAGGTGATCCGCCCCGTTTCATCAACATGGTGACCATCGGCCCCGGTCCCGGCCGC

CTGGAGGCTGAGAAGGCCAGCGGCCAGGCCATGGTGAGCGACGGCCCGGGCCCC
GGCCACCTGGACGACAACGCGGCCGGCCCGCGTCGGCATCCGCGCCTGGTAA