



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Análisis de resistoma de *Bartonella bacilliformis* y  
predicción de proteínas blanco de drogas**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

**AUTOR**

Mariella Evelyn FARFÁN LÓPEZ

**ASESOR**

Dra. Ruth Hortensia GARCÍA DE LA GUARDA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

## Referencia bibliográfica

---

Farfán, M. (2022). *Análisis de resistoma de Bartonella bacilliformis y predicción de proteínas blanco de drogas*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Farfán López Mariella Evelyn
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42229589
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-5621-8955">https://orcid.org/0000-0001-5621-8955</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Ruth Hortensia García de la Guarda
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06041081
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-4801-5642">https://orcid.org/0000-0003-4801-5642</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	PABLO SERGIO RAMÍREZ ROCA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	.06183797
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	DAN ERICK VIVAS RUÍZ
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41951131
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	JORGE LUIS PERALTA ARGOMEDA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	44384768
<b>Miembro del jurado 3</b>	
Nombres y apellidos	
Tipo de documento	

Número de documento de identidad	
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	A.1.3.1 SALUD PUBLICA
Grupo de investigación	Genómica Funcional de Microorganismos y Biorremediación - MICROGEN
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos de Investigación para Grupos de Investigación (Pconfigi 2019) - N°B19100091.  Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET Godoy Cruz 2290 (C1425FQB) CABA -Subsidiado por la agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. CONVOCATORIA PICT 2015. PICT-2015-1863.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Edificio: Pabellón de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas- Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Avenida: Av. Venezuela cdra. 34, Av. Universitaria s/n. Latitud: -11.77453 Longitud: -76.98543
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Agosto 2018 - diciembre 2019
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01</a>



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

Universidad del Perú. Decana de América



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Exped. N° 207v-UPG-FCB-2021**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)**

Siendo las 15:00 horas del día jueves 21 de julio de 2022, en Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace [meet.google.com/ier-ejmd-ajs](https://meet.google.com/ier-ejmd-ajs), el Jurado de Tesis conformado por:

Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca	(Presidente)
Dr. Dan Erick Vivas Ruíz	(Miembro)
Mg. Jorge Luis Peralta Argomeda	(Miembro)
Dra. Ruth Hortensia García de la Guarda	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la señora Bachiller Doña **MARIELLA EVELYN FARFÁN LÓPEZ**.

Después de darse lectura al **Expediente N° 207v-UPG-FCB-2021**, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

**“ANÁLISIS DE RESISTOMA de *Bartonella bacilliformis* Y PREDICCIÓN DE PROTEÍNAS BLANCO DE DROGAS”**, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

Universidad del Perú. Decana de América



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSGRADO**

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: MUY BUENO con la nota de DIECIOCHO (18)

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular, a la señora Bachiller **MARIELLA EVELYN FARFÁN LÓPEZ**.

Siendo las 16:15 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día jueves 21 de julio del año 2022.



Firmado digitalmente por RAMIREZ  
ROCA Pablo Sergio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 21.07.2022 22:55:36 -05:00



Firmado digitalmente por GARCIA DE  
LA GUARDA Ruth Hortensia FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 21.07.2022 18:31:53 -05:00

.....  
**Dr. Pablo S. Ramírez Roca**  
Profesor Principal a D.E.  
PRESIDENTE  
[pramirezr@unmsm.edu.pe](mailto:pramirezr@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0001952

.....  
**Dra. Ruth H. García de la Guarda**  
Profesora Principal D.E.  
ASESORA  
[rgarciad@unmsm.edu.pe](mailto:rgarciad@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0001951



Firmado digitalmente por VIVAS RUIZ  
Dan Erick FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 21.07.2022 16:54:11 -05:00



Firmado digitalmente por PERALTA  
ARGOMEDA Jorge Luis FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 21.07.2022 23:55:21 -05:00

.....  
**Dr. Dan Erick Vivas Ruíz**  
Profesor Asociado a T.C.  
MIEMBRO  
[dvivasr@unmsm.edu.pe](mailto:dvivasr@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0004721

.....  
**Mg. Jorge L. Peralta Argomeda**  
Profesor Auxiliar a T.P.  
MIEMBRO  
[jperaltaa@unmsm.edu.pe](mailto:jperaltaa@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0050236

## FINANCIAMIENTO

Esta tesis ha sido financiada por el siguiente proyecto:

- ✓ PCONFIGI 2019 del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, titulado “Análisis del genoma completo de *Bartonella bacilliformis* para entender su resistoma y predecir proteínas blanco de drogas”, con código N° B19100091, bajo la responsabilidad de la Dra. Ruth Hortensia García de la Guarda.
  
- ✓ CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Godoy Cruz 2290 (C1425FQB) CABA – República Argentina. Subsidiado por la agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. CONVOCATORIA PICT 2015. “Exploración y priorización de blancos moleculares para el diseño de nuevos fármacos contra *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis*” PICT-2015-1863. Bajo responsabilidad del Dr Darío do Porto.



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a la virgen por permitirme seguir en pie y ver la luz cada mañana.

Agradezco a mi asesora Ruth García de la Guarda por su paciencia y apoyo en el desarrollo de mi tesis.

Agradecer a mi asesor externo Dr. Darío, a Ezequiel y a Federico por su enorme aporte académico, por subir el genoma de Bartonella y crear los algoritmos computacionales para los análisis que se han hecho en mi tesis, sin el aporte de su plataforma Target Pathogen, no hubiera sido posible terminar. Gracias por las largas horas de enseñanza, las videollamadas y la insistencia en obtener los mejores resultados.

Agradecer a CABANA (Proyecto de fortalecimiento de capacidades para bioinformática en América Latina) por la beca de entrenamiento en la Universidad de Cuyo Mendoza- Argentina sobre blancos moleculares y proteínas drogables.

Agradezco a mi esposo Dr. Abraham Espinoza, por ayudarme a ser mejor cada día, por levantarme, por no dejarme caer y por insistir en el término de mi tesis.

## DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mis 4 hijos,  
a Dyogo por acompañarme día a día y  
seguir de cerca mis clases,  
a Matehus por acompañarme  
algunas veces al laboratorio,  
por hacerme muchas preguntas  
y por llenarme de abrazos;  
a María Alejandra por ser parte de mi  
en ese momento y dándome fuerzas para seguir,  
a mi querido Isaac por las largas noches  
de lectura de paper,  
mi pequeño Isaac con tu nacimiento  
se publicó el paper.  
Muchas gracias por los abrazos que recibí de uds,  
son mi motor y motivo para seguir avanzando.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS	Vii
ÍNDICE DE FIGURAS	Viii
ÍNDICE DE TABLAS	Ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	Xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Epidemiología de la Enfermedad de Carrión en el Perú.	3
2.2. Tratamiento de la Enfermedad de Carrión	4
2.3. Resistencia antimicrobiana de <i>B. bacilliformis</i>	4
2.4. Bombas de eflujo relacionadas a la resistencia antimicrobiana	7
2.5. Drogabilidad de proteínas del genoma de <i>B. bacilliformis</i> .	9
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	11
4.1. Objetivo general	11
4.2. Objetivo específico	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1 Secuencias genómicas de <i>B. bacilliformis</i> .	12
5.2 Detección de genes asociados a la resistencia en <i>B. bacilliformis</i> KC583 utilizando PATRIC database	12
5.3 Detección de genes asociados a la resistencia en <i>B. bacilliformis</i> utilizando GenBank.	12
5.4 Detección de genes de resistencia en <i>B. bacilliformis</i> utilizando CARD.	13
5.5 Búsqueda de bombas de eflujo en <i>B. bacilliformis</i> KC583.	13
5.6 Predicción de proteínas drogables en <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07.	14
5.6.1 Generación de modelos estructurales de proteínas basados en homología para <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07.	15

5.6.2. Evaluación de drogabilidad de las proteínas de <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07.	17
5.6.3 Criterios <i>off-Target</i> de <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07.	17
5.6.4. Construcción de la red metabólica para <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07.	18
5.6.5. Integración y priorización de blancos drogables para <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07 en Target	19
5.7. Caracterización de proteínas drogables de <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07	19
5.7.1. Localización celular.	20
5.7.2. Función e interacción molecular.	20
5.7.3. Esencialidad.	20
5.7.4. Punto isoelectrico y peso molecular.	21
6. Resultados	22
6.1. Análisis de las secuencias genómicas de <i>B. bacilliformis</i> .	22
6.2. Detección de genes de resistencia en <i>B. bacilliformis</i> KC583.	23
6.3. Bombas de eflujo de <i>B. bacilliformis</i> KC583 utilizando plataformas bioinformáticas.	30
6.4. Predicción de proteínas drogables de <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07.	35
6.4.1. <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07 presenta estructuras proteicas con cavidades drogables.	35
6.4.2. Reconstrucción de la red metabólica de <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07.	37
6.4.3. Integración de datos metabólicos, drogabilidad y criterio <i>off Target</i> , permite identificar y priorizar posibles dianas moleculares en el desarrollo de fármacos contra <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07.	39
6.5. Caracterización de las proteínas blanco de drogas para <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07.	42
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIÓN	57
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

## ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	<b>Adenosin trifosfato</b>
<b>Chk</b>	<b>Chockepoint</b>
<b>DS</b>	<b>Score de drogabilidad</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>DHFR</b>	<b>Dihidrofolato reductasa</b>
<b>EC</b>	<b>Enfermedad de Carrión</b>
<b>HD</b>	<b>Altamente drogable</b>
<b>HC</b>	<b>Alta centralidad</b>
<b>M</b>	<b>Proteína modelo</b>
<b>Mw</b>	<b>Peso molecular</b>
<b>NADP</b>	<b>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato</b>
<b>NCBI</b>	<b>Centro nacional de información biotecnológica</b>
<b>NHH</b>	<b>Proteínas con estructura y no homólogas</b>
<b>ORF</b>	<b>Marco abierto de lectura</b>
<b>PDB</b>	<b>Banco de datos de proteínas</b>
<b>PFAM</b>	<b>Base de datos de familias de proteínas</b>
<b>PGDB</b>	<b>Base de datos de ruta genómica</b>
<b>PI</b>	<b>Punto isoeléctrico</b>
<b>PSORTb</b>	<b>Base de datos de localización subcelular de proteínas</b>
<b>QRDR</b>	<b>Región determinante de resistencia a quinolonas</b>
<b>Uniprot</b>	<b>Repositorio universal de proteínas</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Panorama de resistencia a antibióticos en <i>B. bacilliformis</i> : (A) Resistencia a macrólidos. (B) Resistencia a rifampicina (C) Resistencia a quinolonas (D) Resistencia a cloranfenicol.	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Clasificación de bombas de eflujo en bacterias.	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b> Flujo de trabajo para la búsqueda de genes y bombas de eflujo, relacionadas con la resistencia antimicrobiana en <i>B. bacilliformis</i> KC583.	<b>14</b>
<b>Figura 4.</b> Flujo de trabajo para la priorización de blancos moleculares en <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07.	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Alineamiento de genomas de <i>B. bacilliformis</i> usando Mauve.	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Predicción <i>in Silico</i> de genes y bombas de eflujo involucrados en el mecanismo molecular de resistencia a antibióticos en <i>B. bacilliformis</i> .	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Distribución de transportadores presentes en el genoma de <i>B. bacilliformis</i> KC583 usando la base de datos TransportDB.	<b>31</b>
<b>Figura 8.</b> Distribución de las bombas de eflujo en el genoma <i>B. bacilliformis</i> KC583.	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> Histograma del score de drogabilidad (DS) para <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07.	<b>36</b>
<b>Figura 10.</b> Red metabólica de <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07 representada como un gráfico de reacción.	<b>38</b>
<b>Figura 11</b> Esquema general del proceso de priorización en <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07 utilizando filtros Target-Pathogen.	<b>40</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Tratamiento antimicrobiano de la Enfermedad de Carrión.	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b> Mutaciones reportadas en cepas de <i>B. bacilliformis</i> .	<b>7</b>
<b>Tabla 3.</b> Genomas de <i>B. bacilliformis</i> empleados en el estudio.	<b>25</b>
<b>Tabla 4.</b> Genes asociados con la resistencia antimicrobiana en <i>B. bacilliformis</i> KC583, utilizando PATRIC database.	<b>26</b>
<b>Tabla 5.</b> Genes asociados a la resistencia encontrados en <i>B. bacilliformis</i> KC583 usando Genbank.	<b>29</b>
<b>Tabla 6.</b> Genes asociados a la resistencia según CARP.	<b>31</b>
<b>Tabla 7.</b> Bombas de eflujo encontradas en el genoma de <i>B. bacilliformis</i> KC583.	<b>32</b>
<b>Tabla 8.</b> Proteínas de <i>B. bacilliformis</i> USM-LMMB07 clasificadas según la puntuación de drogabilidad.	<b>37</b>
<b>Tabla 9.</b> Proteínas blanco de drogas de <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07 utilizando la plataforma Target Pathogen.	<b>40</b>
<b>Tabla 10.</b> Caracterización de las proteínas blanco de drogas para <i>B. bacilliformis</i> USM- LMMB07	<b>45</b>

## RESUMEN

En este estudio se analizaron 17 genomas de *Bartonella bacilliformis* con el fin de encontrar genes de resistencia a antibióticos a partir de un análisis de homología con otras especies bacterianas. La resistencia intrínseca de esta especie se determinó utilizando las plataformas bioinformáticas PATRIC, GenBank y CARD; se identificó genes asociados a la resistencia a macrólidos, quinolonas, rifampicina, aminoglucósidos y genes de bombas de eflujo relacionadas con la exportación de diversos antibióticos. Además, se hizo la predicción de blancos novedosos para el desarrollo de drogas capaces de combatir el agente causal de la enfermedad de Carrión; esta predicción de blancos drogables se realizó a partir del análisis del proteoma de la cepa *B. bacilliformis* USM- LMMB07 mediante múltiples capas de datos ómicos (genómica, estructurómica y metabolómica) integrados en la plataforma Target Pathogen. Dicho análisis permitió encontrar 17 proteínas e inferir 6 proteínas relevantes que reúnen las características deseables para el desarrollo de nuevos fármacos capaces de combatir *B. bacilliformis*, las cuales son FabI, DHFR - folA, AroA, TrmFO, UppP y MurE. Estas se localizan en el citoplasma y la membrana citoplasmática de la bacteria y participan en los procesos biológicos esenciales para su metabolismo. Se infiere que las proteínas encontradas son buenos blancos moleculares para la elaboración de nuevas drogas en el tratamiento de la enfermedad de Carrión.

Palabras claves: *Bartonella bacilliformis*, resistoma, proteínas blanco de drogas, Enfermedad de Carrión, bioinformática.



## ABSTRACT

In this study, 17 *Bartonella bacilliformis* genomes were analyzed in order to find antibiotic resistance genes based on homology analysis with other bacterial species. The intrinsic resistance of this species was determined using the PATRIC, GenBank and CARD bioinformatics platforms; genes associated with resistance to macrolides, quinolones, rifampicin, aminoglycosides and efflux pump genes related to the export of various antibiotics were identified. In addition, the prediction of novel targets for the development of drugs capable of combating the causal agent of Carrión's disease was made; this prediction of drugable targets was made from the analysis of the proteome of the *B. bacilliformis* USM-LMMB07 strain using multiple layers of omic data (genomic, structural and metabolomic) integrated in the Target Pathogen platform. This analysis made it possible to find 17 proteins and infer 6 relevant proteins that meet the desirable characteristics for the development of new drugs capable of fighting *B. bacilliformis*, which are FabI, DHFR-folA, AroA, TrmFO, UppP and MurE. These are located in the cytoplasm and the cytoplasmic membrane of the bacterium and participate in the biological processes essential for their metabolism. It is inferred that the proteins found are good molecular targets for the development of new drugs in the treatment of Carrión's disease.

Key words: *Bartonella bacilliformis*, resistome, drugable proteins, Carrión's disease, bioinformatics

## I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Carrión (EC) es una infección metaxénica endémica del Perú, Colombia y Ecuador; causada por *Bartonella bacilliformis*, una proteobacteria aeróbica Gram negativa, pleomórfica y flagelada, que es transmitida por un insecto de la familia Psychodidae y de la subfamilia Phlebotominae, específicamente las hembras del género *Lutzomyia*, especialmente de las especies *L. verrucarum* y *L. peruensis*, conocidas popularmente como “titira” o “manta blanca” (Tarazona *et al.*, 2006). *B. bacilliformis*, es una bacteria propia de los humanos ya que no se conoce ningún otro reservorio, y la enfermedad que causa está asociada principalmente con la pobreza, el clima y el poco apoyo financiero que recibe (Gomes y Ruiz, 2018). La Enfermedad de Carrión tiene dos fases clínicas diferentes, la fase temprana o aguda (fiebre de La Oroya), que incluye fiebre y anemia severa, signos que generalmente aparecen aproximadamente 60 días después de la infección y esta fase es fatal para el 40 - 88% de los pacientes sin intervención antibiótica. La otra fase es la crónica o eruptiva (que forma verrugas); ésta es una pirexia anemizante de forma irregular, endémica y no contagiosa caracterizada principalmente por estar acompañada de dolores y contracciones musculares (calambres) (Carrión, 1998), que aparece después de uno o dos meses y se caracteriza por el desarrollo de verrugas (Huarcaya *et al.*; 2011).

En la actualidad el incremento de la resistencia bacteriana es uno de los mayores problemas de salud pública ya que los antibióticos constituyen una de las principales herramientas para controlar y tratar estas infecciones, tanto en medicina humana como veterinaria. Como respuesta a este problema, la industria farmacéutica requiere de nuevos antibióticos que evadan los mecanismos de resistencia bacteriana (Torres, 2012). El tratamiento antibiótico que se sigue para la Enfermedad de Carrión se realiza según las recomendaciones de manuales técnicos del Ministerio de Salud (MINSa) (Pachas, 2001). Actualmente las infecciones con *B. bacilliformis* se tratan con diferentes antibacterianos como ciprofloxacino, cloranfenicol, rifampicina

(Rolain *et al.*, 2004). El tratamiento con estas drogas produce rápida desaparición de la bacteria en sangre; sin embargo, se ha reportado persistencia del microorganismo, después de retirar estos antibióticos (Henríquez *et al.*, 2002, Rolain *et al.*, 2004, Biswas y Rolain 2010, Pérez *et al.*, 2010). Investigaciones anteriores han demostrado que *B. bacilliformis* muestra susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina, así como a otras fluoroquinolonas (Sobraquès *et al.*, 1999, Dörbecker *et al.*, 2006, Flores, 2008); además, se ha determinado que *B. bacilliformis* presenta resistencia natural al ácido nalidíxico (primera quinolona) (del Valle *et al.*, 2010).

La resistencia de las bacterias a los antibióticos interfiere en su eficacia y el cuidado de la salud; hay evidencia significativa para demostrar que el uso indebido de antibióticos eventualmente resultará en el desarrollo de resistencias (Alam *et al.*, 2019).

En este contexto surgió el concepto del resistoma antibiótico, que comprende el conjunto de genes que contribuyen directa o indirectamente a la resistencia a los antibióticos (Wright, 2010).

El estudio del resistoma permite entender las bases moleculares de la resistencia bacteriana (Torres, 2012). Hasta la fecha no hay estudios sobre el resistoma de *B. bacilliformis*.

En esta investigación se analizó el resistoma antibiótico de *B. bacilliformis* y se ha predicho y caracterizado un conjunto de proteínas con características atractivas para la elaboración de nuevas drogas en el futuro, buscando contribuir con el tratamiento de la enfermedad de Carrión.

## **II. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Epidemiología de la enfermedad de Carrión en el Perú**

El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Ministerio de Salud (CDC- MINSA), reportó 81 casos de la enfermedad de Carrión aguda y 15 casos de la enfermedad de Carrión eruptiva, dando un acumulado de 104 casos para el 2019. La región de la Libertad presentó más casos de la enfermedad de Carrión junto con Jaén (CDC, 2019)

En el 2018, se reportó un acumulado de 61 casos de la EC aguda y 34 casos para la enfermedad eruptiva; a diferencia del 2017, donde el número de casos fue de 277 para enfermedad de Carrión aguda y de 136 para la enfermedad eruptiva; siendo las regiones con mayor incidencia, Cajamarca y Cusco (CDC, 2018). Los reportes del 2016 de la enfermedad aguda ascienden a 436 casos, mientras que la enfermedad de Carrión eruptiva llega a 350 casos; al 2015 los casos de la enfermedad de Carrión son bajos (CDC, 2016). Entre el 2002-2014, hasta la semana 35, el departamento de Cajamarca presenta el 44,4% del total de fallecidos, seguido por el departamento de Ancash con el 13,5% de los casos (Guzmán, 2014).

La baja incidencia de casos entre el 2004 al 2010 se logró gracias a las actividades de control químico mediante rociamientos intradomiciliarios, con prioridad en los departamentos que notificaron situación de brotes o incremento de casos. Sin embargo, estas acciones fueron focalizadas, con coberturas muy bajas, de manera que no han impedido que después se presenten brotes de esta enfermedad, como los ocurridos en la provincia de Cutervo (2010 y 2011) del departamento de Cajamarca, en la provincia de Pataz (2011) del departamento de La Libertad y en la provincia de Huancabamba del departamento de Piura (2013) (Guzmán, 2014).

## 2.2 Tratamiento de la Enfermedad de Carrión

En la Tabla 1 se observa el tratamiento de la enfermedad de Carrión, aquí se utiliza el cloranfenicol asociado a otros antibióticos, en especial betalactámicos (Maguiña *et al.*, 2001). Estudios en *B. bacilliformis*, muestran susceptibilidad a múltiples antibióticos, incluyendo la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, rifampicina, macrólidos, tetraciclinas, cotrimoxazol y fluoroquinolonas (Sobraques *et al.*, 1999).

**Tabla 1.** Tratamiento antimicrobiano de la enfermedad de Carrión.

Enfermedad de Carrión						
Grupo	Sin complicaciones		Severa		Verruga	
	1 línea	2 línea	1 línea	2 línea	1 línea	2 línea
Niños y adolescentes <45kg).	Amoxicilina / Acido clavulánico	Ciprofloxacino Cloranfenicol Cotrimoxazol	Ciprofloxacino + Ceftriaxona	Ciprofloxacino + Ceftazidima Ciprofloxacino + amikacina	Azitromicina	Rifampicina Eritromicina Ciprofloxacino
Adolescente mayor 14 años (> 45kg) y adultos	Ciprofloxacino	Amoxicilina /ácido clavulánico Cotrimoxazol Cloranfenicol	Ciprofloxacino + Ceftriaxona	Ciprofloxacino + Ceftazidima Ciprofloxacino + amikacina	Azitromicina	Rifampicina Eritromicina Ciprofloxacino
Mujeres embarazadas	Amoxicilina / ácido clavulánico	Cloranfenicol Cotrimoxazol Amoxicilina	Ceftriaxona + Cloranfenicol	Ceftriaxona + amikacina Ceftazidima + amikacina	Azitromicina	Rifampicina Eritromicina

Fuente: MINSA, 2007.

En la fase aguda se utiliza ciprofloxacino, cloranfenicol, o betalactámicos (Gonzáles, *et al.*, 2007). Hasta 1975 se usó estreptomina en el tratamiento de la fase eruptiva (Maguiña *et al.*, 2001), pero es el uso de rifampicina que logra en poco tiempo la disminución y desaparición de las verrugas (Rolain *et al.*, 2004).

## 2.3 Resistencia antimicrobiana de *Bartonella bacilliformis*.

El incremento de la resistencia bacteriana, en las últimas décadas, es uno de los mayores problemas a nivel mundial. Las bacterias han desarrollado estrategias para defenderse del efecto de los antibióticos, y se debe utilizar otras estrategias para poder controlar el problema de la resistencia (Torres, 2012).

El resistoma antibiótico está constituido por: (i) los genes de resistencia de

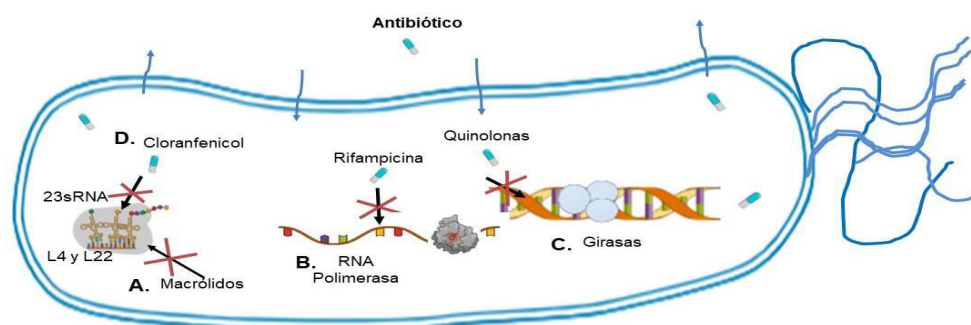
los microorganismos ambientales, muchos de ellos procedentes del suelo, tanto productores como no productores de antibióticos (resistoma ambiental);(ii) los genes de resistencia de las bacterias patógenas (resistoma clínico); (iii) genes intrínsecos presentes en el cromosoma bacteriano que contribuyen a la resistencia (resistoma intrínseco); y por (iv) los genes que codifican proteínas metabólicas pero que podrían ser los precursores de genes de resistencia a los antibióticos a través de procesos evolutivos y que han sido denominados genes de protorresistencia (Torres, 2012).

En el caso de las infecciones por *Bartonella* se caracterizan por una alta frecuencia de las recaídas después de breves ciclos de tratamiento antibiótico, a pesar de que las especies de este género son altamente susceptibles a los antibióticos (Tarazona *et al.*, 2006). Uno de los primeros reportes de aislamiento y caracterización de mutantes de *B. bacilliformis*, fue con el antibiótico coumermicina A1, que tiene como blanco molecular a la girasa B (Vanden *et al.*, 2019). En otro estudio realizado por Battisti, el gen *gyrB* de *B. bacilliformis* fue clonado, expresado y complementado en *E. coli*, este gen presentaba resistencia a courmercina, donde se encontraron mutaciones aminoacídicas asociadas a esta resistencia en las posiciones 124 (G→S), 184 (R→Q), 214 (T→A) y 214 (T→I) del gen *gyrB* (Battisti *et al.*, 1998). También se ha reportado aislados de *B. bacilliformis* con resistencia constitutiva a la quinolona ácido nalidíxico (Flores, 2008), existiendo evidencia científica de mutaciones como la presencia de Ala en la posición 91 y 85 de las proteínas GyrA y ParC, respectivamente, que le confieren resistencia a este antibiótico (Minnick *et al.*, 2003, Gomes *et al.*, 2016).

En la Figura 1C, se representa la resistencia en *B. bacilliformis*, ésta resistencia está asociada al gen *gyrA* que presenta mutaciones asociadas a la resistencia a las fluoroquinolonas y además una mutación natural en la posición 83 (numeración de *E. coli*) (Biswas *et al.*, 2007, Angelakis *et al.*, 2008, Del Valle *et al.*, 2018), esta mutación está asociada con la resistencia a fluoroquinolonas que han sido reportadas en otras bacterias intracelulares y en *B. bacilliformis* (Rolain *et al.*, 2004, Angelakis *et al.*, 2008). En las pruebas de susceptibilidad

*in vitro* de 31 cepas de *Bartonella spp.* Las fluoroquinolonas fueron los antimicrobianos más potentes (Dörbecker *et al.*, 2006). Otros estudios demostraron que existe susceptibilidad disminuida en *B. bacilliformis* para ciprofloxacina como a otras fluoroquinolonas (Sobraquès *et al.*, 1999; Dörbecker *et al.*, 2006; Flores, 2008; Quispe, 2009). También se encontró que la resistencia al cloranfenicol está asociada a la mutación del gen 23sRNA como se representa en la figura 1D (Rolain *et al.*, 2004). La resistencia a rifampicina está asociada al gen *rpoB* (subunidad beta de la RNA polimerasa) (Figura 1B). Por estudios *in vitro* en *B. bacilliformis* (Biswas *et al.*, 2007) y *B. quintana* (Biswas *et al.*, 2009), se han obtenido cepas resistentes a rifampicina, mostrando una mutación en la posición 531 (Ser → Phe) de *rpoB*; Ser, es un aminoácido que presenta más mutaciones en cepas resistentes a este mismo antibiótico en otras especies bacterianas como *Mycobacterium tuberculosis* (Telenti *et al.*, 1993; González, 2005).

En macrólidos como azitromicina, se observó, *in vitro*, la ocurrencia de cambios en las posiciones Δ62-65 (Gomes *et al.*, 2016), Q66K, G70R y H74Y de la proteína L4 (de la subunidad ribosomal 50S) (Figura 1A). En la proteína L22 (de la misma subunidad ribosomal), se produce una inserción de aminoácidos en la posición 83: VSEAHVVGKS y una mutación puntual en el gen 23S rRNA en la posición A1983G (Gomes y Ruiz, 2018).



**Figura 1.** Panorama de resistencia a antibióticos en *B. bacilliformis* (A) Resistencia de macrólidos. (B) Resistencia a rifampicina (C) Resistencia a quinolonas (D) Resistencia a cloranfenicol.

En el caso de la resistencia a tetraciclina, ocurren mutaciones relacionadas a la resistencia a este antibiótico en las posiciones A30T y D48E de la proteína

ribosomal S7 además, se determinó que el cambio en las posiciones G107S y H115R en el dihidrofolato reductasa está asociado a la resistencia a trimetoprina (Mendoza *et al.*, 2015) (Tabla 2)

**Tabla 2.** Mutaciones reportadas en cepas de *B. bacilliformis*.

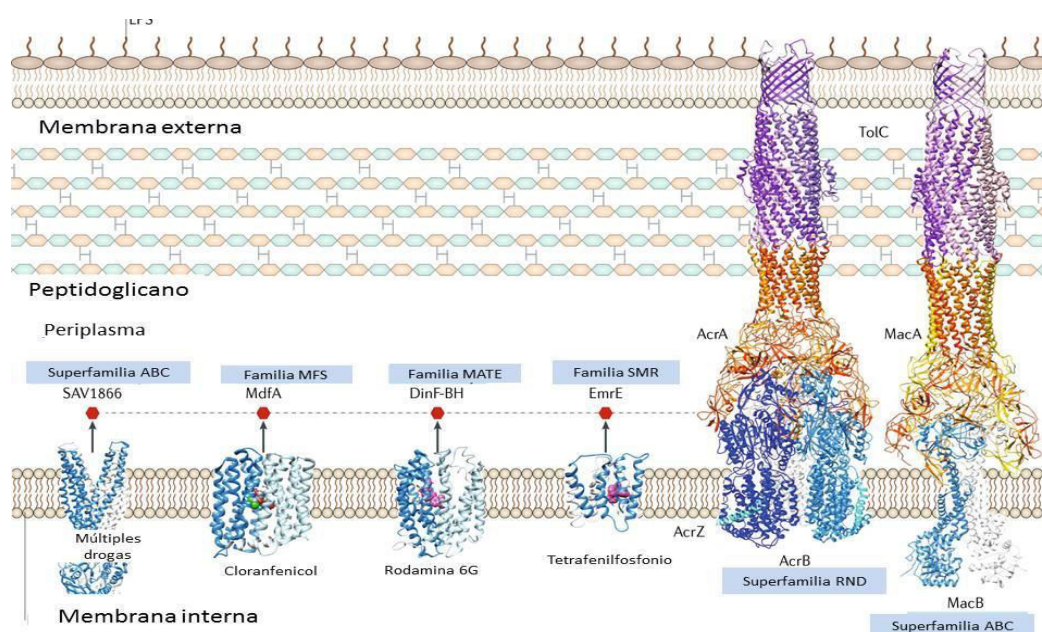
Mutaciones en <i>Bartonella bacilliformis</i>				
Antibiótico	Blanco	Modelo <i>in vitro</i>	Aislado clínico	Referencias
Ciprofloxacino	GyrA	D90G, A91V, D95G, D95N	G89C, A91V, S92P, D95N, D95Y	Gómes, 2010; Biswas, 2008; Biswas, 2007; Angelakis, 2008.
	GyrB	E475K	S474F	Mendoza <i>et al.</i> , 2015
	ParC		A62T	
Azitromicina	Proteína L4 Ribosomal	Δ62-65, Q66K, G70R, H74Y		Gómes, 2010; Biswas, 2007
	Proteína L22 ribosomal	83::VSEAHVGKS		
Tetraciclina	23S Rrna Proteína S7 ribosomal	A1983G	A39T, D48E	Mendoza <i>et al.</i> , 2015
Cloranfenicol	23S rRNA	G2372A		Gómes, 2010
Rifampicina	RpoB	Q527R, H540Y, S545F, S588Y		Gómes, 2010; Biswas, 2007
Trimetoprina	FoIA		M23I, G107S, H115R	Mendoza <i>et al.</i> , 2015 a
Coumermicina A1	GyrB	G124S, R184Q, T214A, T214I		Battisti, 1998

## 2.4. Bombas de eflujo relacionadas a la resistencia antimicrobiana.

Las proteínas transportadoras juegan un papel muy importante en el ciclo de vida de las bacterias, en la captación de nutrientes, adaptación, eliminación de sustancias tóxicas como antibióticos, colorantes, entre otros. Las bombas de eflujo son maquinarias proteicas de transporte de membrana que exportan sustancias tóxicas desde el interior hacia afuera de la célula, entre ellas, los antibióticos, las bombas de eflujo están íntimamente relacionadas al desarrollo de la resistencia antimicrobiana (Rahman *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2018) y



contribuyen a la resistencia intrínseca, como mecanismo de evasión a los antibióticos (Szmolka y Nagy, 2013). Las bombas de eflujo se clasifican en 5 grandes superfamilias: Proteínas de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, *multidrug and toxic-compound extrusion*), la superfamilia facilitadora principal (MFS, *major facilitator superfamily*), la familia pequeña de resistencia a multifármacos (SMR, *small multidrug resistance*), la familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*), y la superfamilia de *cassette* de unión al ATP (ABC, *ATP binding cassette*) (Piddock, 2006; Marchetti *et al.*, 2011), tal como se indica en la Figura 2.



**Figura 2.** Clasificación de bombas de eflujo en bacterias.

Fuente: Du *et al.*, 2018.

## 2.5. Priorización de blancos moleculares mediante la plataforma Target

## Pathogen

Las secuencias genómicas de los patógenos han creado nuevas oportunidades para el descubrimiento y desarrollo de fármacos para combatirlos, incluidas nuevas cepas resistentes y multirresistentes ; con esta finalidad se creó la plataforma Target-Pathogen, que está diseñada y desarrollada como un recurso en línea que permite la integración y ponderación de información de proteínas como: función, rol metabólico, propiedades estructurales, incluida la drogabilidad, esencialidad y experimentos ómicos, para facilitar la identificación y priorización de objetivos de fármacos candidatos en patógenos (Sosa *et al.*, 2018).

Uno de los primeros trabajos desarrollados por la plataforma Target Pathogen (TP) fue encontrar un enfoque integrador y multiómico hacia la priorización de los blancos moleculares para *Klebsiella pneumoniae*. El grupo de TP desarrolló una metodología para la predicción de la capacidad de drogabilidad basada en el algoritmo de detección de Pocket de código abierto fpocket, y combinó varios descriptores fisicoquímicos para estimar la capacidad drogable del pocket, además se puede utilizar a gran escala genómica. Finalmente con base en el análisis previo de la distribución de la puntuación de drogabilidad (DS) para todos los pockets que contienen un compuesto similar a un fármaco en el AP, los pockets se clasificaron en cuatro categorías: no drogables ( $0,0 \leq DS < 0,2$ ), poco drogables ( $0,2 \leq DS < 0,5$ ), drogables ( $0,5 \leq DS < 0,7$ ) y altamente drogables ( $0,7 \leq DS \leq 1,0$ ) (Sosa *et al.*, 2018).

La drogabilidad es un concepto que se utiliza para describir la capacidad de las proteínas para unirse a compuestos similares a los fármacos, lo que lleva a la modulación de proteínas de la forma deseada (Sosa *et al.*, 2018). Las proteínas drogables deben tener una cavidad (pocket) bien definida con características fisicoquímicas adecuadas y atributos que permitan la predicción de los sitios de unión de drogas (Cheng *et al.*, 2007, Xie y Bourne, 2007).

En otro de los trabajos de priorización de blancos moleculares que utilizó esta plataforma, uso conjunto de filtros aplicados que incluyó primeramente

descartar todas aquellas proteínas con score de drogabilidad,  $DS < 0.5$ , luego un segundo filtro incorporado al análisis fue el de eliminar todas las proteínas de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* N315 con una identidad superior al 40% respecto a las proteínas humanas. La siguiente etapa en la priorización de blancos moleculares consistió en realizar una función de scoring (SF) para obtener una lista de proteínas ranqueadas de acuerdo con su interés como potenciales blancos. La función de scoring define la importancia de una proteína como blanco de acuerdo criterios establecidos por la expertiz de cada investigador. En este caso se tuvieron en cuenta criterios de esencialidad, conservación y contexto metabólico. (Serral, 2021).

En este trabajo de investigación se analizó la resistencia a los antibióticos de *B. bacilliformis*, utilizando herramientas bioinformáticas en línea y bases de datos libres donde se encuentran depositados los genomas de esta bacteria.

Debido a la necesidad de un tratamiento eficaz contra la enfermedad de Carrión (EC), ya que hay reportes de resistencia a las drogas que se usan para el tratamiento actual, es preciso analizar el resistoma de *B. bacilliformis* para comprender sus mecanismos genéticos de resistencia antimicrobiana y buscar proteínas únicas en la bacteria que tengan alta drogabilidad para que sirvan de blancos moleculares de drogas, como estrategia para el uso racional de fármacos.

## 1. HIPÓTESIS

*B. bacilliformis* presenta genes involucrados en la resistencia antimicrobiana, conformando un resistoma. Así mismo presenta proteínas blanco con características atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- Analizar el resistoma *Bartonella bacilliformis* y predecir las proteínas de esta especie con características atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Analizar y comparar los genomas de *Bartonella bacilliformis*.
- Analizar el resistoma de *Bartonella bacilliformis* KC583 usando herramientas bioinformáticas.
- Determinar y caracterizar las proteínas drogables de *B. bacilliformis* USM- LMMB07.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Análisis de las secuencias genómicas de *B. bacilliformis*.**

Para el análisis genómico de *B. bacilliformis* se siguió el flujo de trabajo de la figura 3, aquí se evaluaron 17 genomas, que se obtuvieron de la plataforma del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Bartonella+bacilliformis>). Ver tabla 3.

Los genomas se analizaron con el programa Mauve; se alinearon y se observó si existían diferencias de genes o mutaciones puntuales que indiquen algún tipo de resistencia en los genes secuenciados, en comparación con *B. bacilliformis* KC583.

### **5.2. Detección de genes asociados a la resistencia en *B. bacilliformis* KC583 utilizando Patric Database.**

Para la detección de genes asociados a la resistencia, se usó Patric, un sistema de información que integra información de patógenos con herramientas de análisis y datos valiosos. PATRIC agudiza y perfecciona el alcance de los datos filogenéticos bacterianos disponibles de numerosas fuentes al realizar análisis comparativos, genómica comparativa completa y otros análisis (Wattam *et al.*, 2016) (<https://www.patricbrc.org/>). Aquí se ingresó como usuario, se realizó la búsqueda seleccionando el genoma de *B. bacilliformis* KC 583 por la opción de búsqueda de genes especiales, luego en la misma tabla se selecciona la opción *antibiotic resistance* y se obtiene una tabla excell con los resultados. Ver tabla 4.

### **5.3. Detección de genes asociados a la resistencia en *B. bacilliformis* KC583 utilizando GenBank.**

En la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) se realizó una búsqueda de los genes relacionados a la resistencia, genes ya estudiados de *B. bacilliformis* KC583, fueron tomados de la literatura publicada en el NCBI que están relacionados con el tratamiento de la EC, (Tabla 2) se tomó el gen indicado en la literatura, el gen que presentaba la resistencia y se buscó en el genoma de *B. bacilliformis* KC583, luego se hizo una búsqueda

empleando el BLAST y se comparó con otros géneros bacterianos en comparación con el genoma de *B. bacilliformis* KC583; aquí se vio la similitud y ese resultado se analizó. Este procedimiento se hizo de forma manual e individual. Finalmente se revisaron los resultados de la similitud con el gen resistente de *Bartonella bacilliformis* KC583 y se buscó la publicación y/o estudio de este resultado en esta plataforma. Ver resultados en Tabla 5.

Los parámetros generales del Blast utilizado, fueron: Max target sequences 100, umbral esperado de 0.05.

#### **5.4. Detección de genes de resistencia en *B. bacilliformis* utilizando la plataforma CARD.**

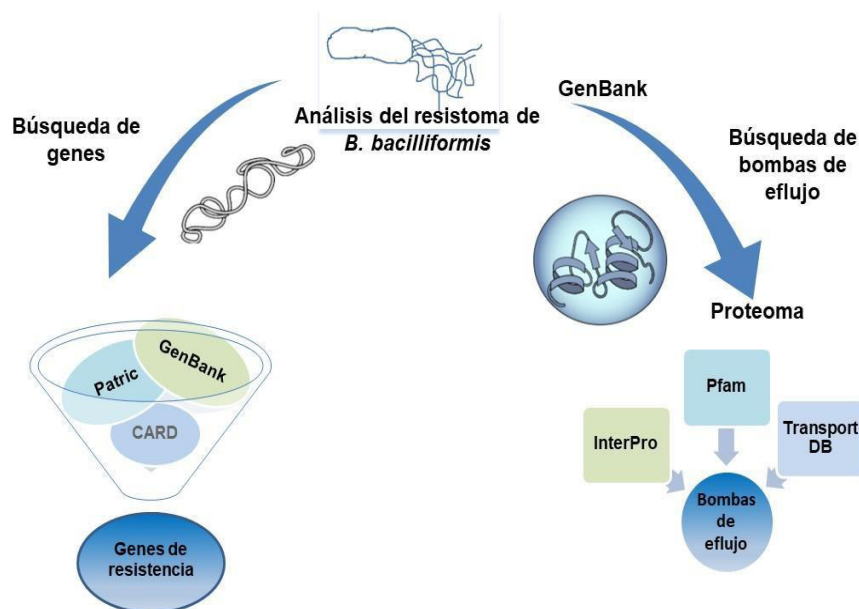
La plataforma CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database)(<https://card.mcmaster.ca/>)(Alcock *et al.*, 2020) (<https://card.mcmaster.ca/home>) se utilizó para obtener de su base de datos, los genes asociados a la resistencia en *Bartonella bacilliformis*. En esta plataforma se colocó en la opción buscar *Bartonella bacilliformis*, y nos dio como resultado, genes que confieren resistencia para esta especie. Ver tabla 6

#### **5.5. Búsqueda de bombas de eflujo en *B. bacilliformis* KC583.**

El proteoma de *B. bacilliformis* KC583, se obtuvo de la base de datos de proteínas Uniprot (Consortium, 2018), en donde se accedió a la cepa referencial KC583; el proteoma fue analizado para predecir cuántas proteínas son bombas de eflujo y clasificarlas en las familias correspondientes, para lo cual se utilizó la plataforma Pfam (Finn *et al.*, 2016), la herramienta InterPro (Finn *et al.*, 2017) y la base de datos TransportDB (Elbourne *et al.*, 2017) (Figura 7).

Este proteoma fue analizado para determinar cuántas proteínas forman parte de una bomba de eflujo (Tabla 7). Se clasificaron en las familias correspondientes, para lo cual se verificaron las bombas de eflujo en la base de datos Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2016) y en la plataforma InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> (Finn *et al.*, 2017) que proporciona un análisis funcional de las proteínas, también se

utilizó la base de datos Transport DB (Transporter Protein Analysis Database), para ver la distribución de los transportadores presentes en el genoma de *B. bacilliformis* KC583 (Elbourne *et al.*, 2017).



**Figura 3.** Flujo de trabajo para la búsqueda de genes y bombas de eflujo, relacionadas con la resistencia antimicrobiana en *B. bacilliformis* KC583.

### 5.6. Predicción de blancos moleculares en *B. bacilliformis* USM-LMMB07.

Para este estudio se utilizó la cepa de *B. bacilliformis* USM-LMMB07, que fue aislada por nuestro grupo de estudio y presenta alto porcentaje de similitud de *B. bacilliformis* KC583, además que esta última cepa tiene completo su genoma.

En la determinación de las proteínas blanco de potenciales drogas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07, se siguió el esquema de trabajo de la Figura 4; esta cepa fue aislada por primera vez por nuestro grupo de investigación de la UNMSM-Perú, durante un brote en el distrito Carmen de la Frontera, provincia de Huancabamba, Región Piura, en el 2011 (Espinoza, 2014).

El genoma secuenciado comprende un total de 1143 proteínas, todas las anotaciones y las secuencias de esta bacteria están disponibles en

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/524>), bajo el número de acceso NZ\_LQXX01000001.1.

### **5.6.1. Generación de modelos estructurales de proteínas basados en homología estructural para *B. bacilliformis* USM- LMMB07.**

Debido que no se encontraron estructuras proteicas cristalizadas de *B. bacilliformis* depositadas en el Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000) se construyeron modelos basados en homología para todas las secuencias del proteoma utilizando MODELLER V 9.25 (Webb *et al.*, 2014), siempre y cuando se contara con el molde adecuado. Los moldes fueron obtenidos a través de la construcción de perfiles PSSM, para cada una de las proteínas mediante la utilización de PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), con un E-value de  $10^{-4}$  y 3 interacciones contra la base de datos UniRef50 (base de datos de secuencia no redundante, donde las secuencias se agrupan con 50% de identidad de secuencia, generada de dos pasos anteriores de clusterización de base de datos Uniprot). Una vez que se obtuvo una matriz de puntuación específica de posición (PSSM), se usó para buscar contra PDB95 (proteínas PDB no redundantes con un umbral de identidad de secuencia del 95%) usando PSI-BLAST con valor  $E \leq 10^{-5}$  ( $-e 1e^{-05}$ ) como umbral de corte. Se usaron hasta cinco estructuras PDB recuperadas como plantillas para el modelado basado en homología usando MODELLER. Se utilizó MODELLER sin modificar los parámetros implementados por defecto por el software. Se construyeron cinco modelos por plantilla para cada proteína *B. bacilliformis*. Los modelos se clasificaron mediante la puntuación GA341. Sólo se conservaron los modelos con GA341 por encima de 0,7 y más del 60% de cobertura. Se eligió el modelo que maximiza la puntuación Z de QMEAN para análisis adicionales. Los mejores modelos se eligieron con QMEAN-Z entre menos dos y dos. Con esta estrategia, se pudo construir un total de 882 modelos estructurales de un total de 1143 ORF presentes en el genoma *B. bacilliformis*.

Entre los parámetros que se pueden analizar para estimar la confiabilidad de un modelo se destacan la identidad y cobertura con el molde, GMQE,



QMeanDisCo global, QMeaDisCo local y los Qmean z-scores. Como se mencionó anteriormente se utilizó un e-value de  $E \leq 10^{-5}$  como umbral de corte para asegurar modelos que presenten alta identidad y cobertura con respecto a la proteína a ser modelada. GMQE es un estimador cuyo score tiene en cuenta cuán bueno es el alineamiento entre templado y target y la estructura del templado, pudiendo predecir el test de diferencia de distancias locales (IDDT) del modelo que se obtendría a partir de este templado evaluando la distancia local entre los átomos y el modelo que se construiría. En términos generales, cuanto mayor es el GMQE, que toma valores de 0 a 1, mejor calidad tendrá el modelo. Luego, si ese templado es elegido, el GMQE se actualiza tras construir el modelo. QMean determina la calidad del modelo. Está expresado como Z-score ya que indica cuán cerca está el Qmean del promedio de QMeans de las estructuras experimentales depositadas en el PDB. Si el Qmean es cercano a cero el modelo se considera de buena calidad, ya que es cercano al Qmeans que se obtendría tras generar un modelo a partir de un método experimental. A su vez el QMean integra otros cuatro potenciales estadísticos de interacción, los de los carbonos beta, el de todos los átomos, la solvatación y las torsiones. QMeanDisCo también es un parámetro que indica la calidad del modelo, es similar al QMean sólo que incluye también la predicción de la calidad del modelo por residuo a partir de la comparación de las distancias entre residuos con restricciones de distancia tomadas de estructuras homólogas a el modelo. Se encuentra en el rango de 0 a 1. El local indica el QMeanDisCo por aminoácido, y el global el promedio de toda la proteína. A partir del local entonces se puede evidenciar que zonas el modelo predice mejor su estructura y en qué zonas lo predice sin tanta confianza. A los fines de simplificar y automatizar el análisis de calidad de los modelos y, teniendo en cuenta que todos los estimadores mencionados están relacionados, se eligió el modelo que maximiza el valor de QMean para cada caso.

### **5.6.2. Evaluación de la drogabilidad de las proteínas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07.**

Para la búsqueda de blancos moleculares, se utilizó la plataforma TARGET PATHOGEN, plataforma que, mediante el uso de herramientas computacionales, reúne a un conjunto plataformas curadas, mediante algoritmos, con la finalidad de interactuar la base de datos de cada una de ellas.

Drogabilidad es la capacidad de una proteína para unirse a un fármaco, lo que lleva a la modulación o inhibición de la proteína, en el caso de los antibióticos (Sosa *et al.*, 2018).

La drogabilidad de las proteínas se evaluó con el algoritmo de código abierto: fpocket (<http://fpocket.sourceforge.net/>) que combina varios descriptores fisicoquímicos para estimar la drogabilidad de las actividades presentes en las proteínas. Considerando la distribución de la puntuación (DS) de las cavidades de las proteínas que albergan un compuesto similar a la droga en el PDB, las cavidades fueron clasificadas en cuatro categorías, no drogables ( $0.0 \leq DS < 0.2$ ) poco drogables ( $0.2 \leq DS < 0.5$ ), drogables ( $0.5 \leq DS < 0.7$ ) y altamente drogables ( $0.7 \leq DS < 1.0$ ) (<http://target.sbg.qb.fcen.uba.ar/patho/user/methodology>).

### 5.6.3. Criterios off-Target de *B. bacilliformis* USM-LMMB07.

Todas las proteínas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 se sometieron a NCBI-BLASTp (valor  $E < 10^{-7}$ ) contra el proteoma humano (acceso de ensamblaje NCBI GCF\_000001405.36) para identificar blancos no homólogos a las proteínas del humano. Los hallazgos con *E-value* menor a  $10^{-5}$  e identidad mayor  $\geq 40\%$  fueron descartados, dado que pueden compartir un alto grado de conservación estructural que podría producir efectos adversos si la proteína bacteriana es utilizada como blanco (Sosa *et al.*, 2018) del mismo modo, la posible inhibición de una proteína similar con nuestro metagenoma bacteriano benéfico, podría provocar efectos adversos. Para mitigar esta posibilidad, las proteínas *B. bacilliformis* USM-LMMB07 se compararon con las proteínas de

las 226 especies bacterianas de la flora intestinal humana secuenciados por el proyecto del Microbioma humano (NIH HMP, 2009). BLASTp evaluó el número de organismos de microbiota que muestran al menos una coincidencia significativa con el criterio anterior de evaluación mencionado (valor  $< 10^{-5}$  e identidad  $\geq 40\%$ ). El objetivo de esto fue identificar proteínas candidatas para las cuales los fármacos que se desarrollen presentan una selectividad mejorada hacia el patógeno bacteriano, minimizando así el impacto en el microbiota intestinal comensal.

#### **5.6.4. Construcción de la red metabólica de *B. bacilliformis* USM-LMMB07**

Para construir la red metabólica de *B. bacilliformis* USM-LMMB07; se utilizó el módulo PathoLogic de Pathway Tools v. 20.0. (Karp *et al.*, 2011) Con esta herramienta se creó una base de datos de Pathway / Genome (PGDB) que contiene las vías metabólicas predichas de un organismo determinado. Esta reconstrucción metabólica se basó principalmente en el número de clase de enzimas correspondiente y la anotación de las enzimas metabólicas se hicieron manualmente durante la anotación genómica de la cepa *B. bacilliformis* USM-LMMB07 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_001624625.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_001624625.1)).

Después de la curación manual de la reconstrucción de la red metabólica se completó y se exportó en SBML, formato para un análisis más detallado. En particular, esas reacciones llamadas "moléculas pequeñas", (es decir, reacciones que implican pequeños compuestos) fueron exportados para reducir la complejidad de la red al evaluar medidas topológicas y reacciones de punto de estrangulamiento (Yeh *et al.*, 2004). Una vez que se exportó la red, se verificó la frecuencia con la que cada uno de los metabolitos aparecía dentro de las reacciones mediante script de Python *in-house*. Los compuestos que aparecen con mayor frecuencia dentro de las reacciones y que no participan en el flujo de carbono se consideraron ubicuos (compuestos implicados en un número significativo de reacciones), como ATP, agua y protones. Estos compuestos ubicuos se eliminaron posteriormente de la red porque pueden generar interacciones artificiales dentro del metabolismo.

### **5.6.5. Integración y priorización de blancos de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 en Target-Pathogen.**

Todos los datos calculados previamente se integraron en Target-Pathogen (Sosa *et al.*, 2018) que incluye una base de datos y un servidor web para la priorización de blancos de drogas. La Figura 04 representa el flujo de trabajo que se siguió para la priorización de blancos moleculares en Bartonella.

Usando esta herramienta, se obtuvo una lista priorizada de proteínas con características deseables para blancos drogables. Para lograr esto se aplicaron los siguientes filtros que se detallan en la Figura 11, aquí se descartaron aquellas proteínas para las cuales no se pudo modelar su estructura tridimensional, posteriormente las proteínas con DS <0,7 (proteínas no drogables, poco drogables y drogables) y aquellas que podrían reaccionar de forma cruzada con el hospedador humano (según los criterios mencionados anteriormente) fueron descartadas. En consecuencia, sólo se analizaron las proteínas clasificadas como altamente drogables (DS>0,7) que no interfirieran con proteínas del hospedador y que tuvieran elevada centralidad (>0.1), la reacción se considera altamente central, cuando la misma se encuentra involucrada en un número considerable de vías metabólicas (Sosa *et al.*, 2018). Filtros adicionales incluyeron que las proteínas resulten esenciales para la supervivencia o desarrollo del patógeno, que participen en reacciones chokepoint (-verdadero-) y además que sus cavidades fueran capaces de unir una droga (-verdadero-) (Sosa *et al.*, 2018).

### **5.7. Caracterización de proteínas drogables de *B. bacilliformis* USM-LMMB07.**

En esta parte se caracterizó las proteínas drogables, para predecir localización celular, función e interacción molecular, esencialidad, punto isoeléctrico y peso molecular, utilizando las siguientes plataformas bioinformáticas; PSORTTb v3.0, Uniprot KB, DEG y Compute pl / Mw.

#### **5.7.1. Localización celular.**

Se ingreso a la plataforma de PSORTb v3.0 (<https://www.psort.org/psortb/>) y se completan los datos como tipo de bacteria, tipo de GRAM, formato de salida y correo, donde llegan los resultados, finalmente se carga y se copia la secuencia FASTA de la proteína de interés (Yu *et al.*, 2010).

### **5.7.2 Función e interacción molecular.**

Se utilizó la plataforma Uniprot KB (Consortium, 2018) (<https://www.uniprot.org/>), y se colocó el nombre de la proteína en la barra de búsqueda de UniProtKB, luego como resultado se obtiene un cuadro con las características de la proteína como longitud, nombre del gen al que pertenece la proteína, tipo de organismo, código de acceso; en este último se hace clic y nos da toda la información relevante de la proteína como: Función molecular y procesos biológicos.

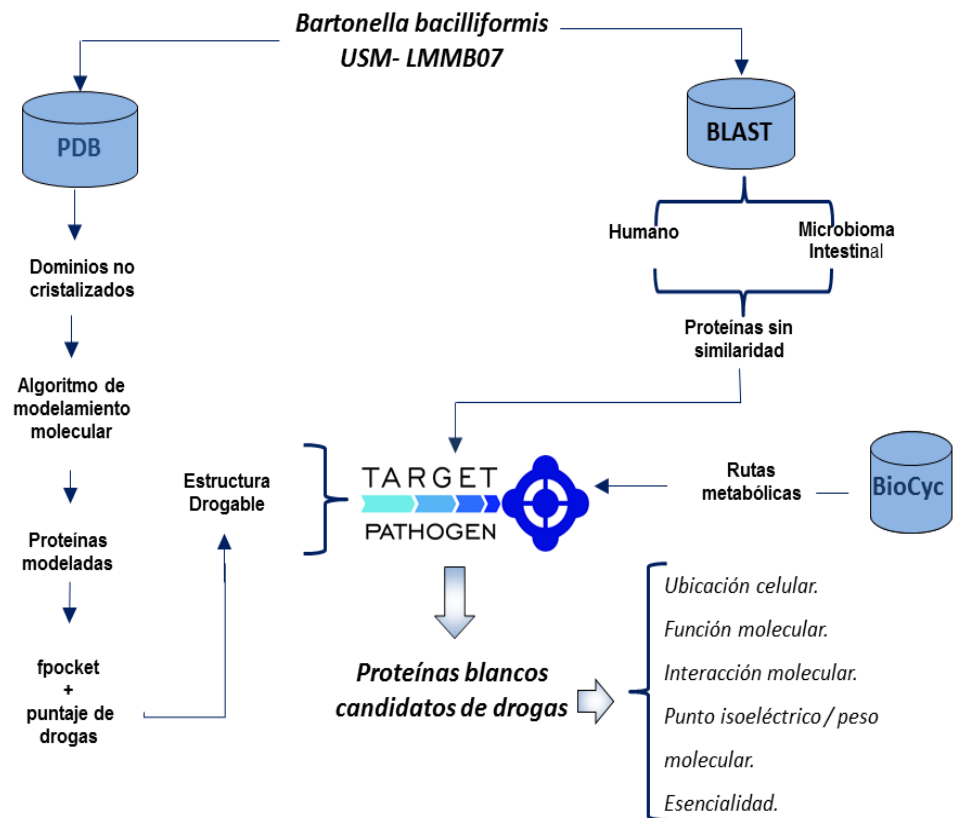
### **5.7.3. Esencialidad.**

El proteoma de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 se comparó con la base de datos de genes esenciales (DEG) (<http://www.essentialgene.org/>). La herramienta utilizada para llevar a cabo dicha comparación fue BLASTp, de modo de evaluar la identidad de las proteínas de *Bartonella* respecto a proteínas de diversos microorganismos que conforman la base de datos de DEG. Las proteínas pertenecientes a DEG se encuentran clasificadas como proteínas esenciales a partir de ensayos experimentales, por lo tanto, si para una determinada proteína se encuentra un homólogo esencial, es probable que ésta sea también esencial ya que las funciones codificadas por genes esenciales se encuentran ampliamente conservadas en los microorganismos (Kobayashi *et al.*, 2003). Ver resultados en la Tabla 9.

### **5.7.4. Punto Isoeléctrico y Peso Molecular.**

Compute pI / Mw (Gasteiger *et al.*, 2005), es una herramienta que permite el

cálculo de  $pI$  teórico (punto isoelectrico) y  $M_w$  (peso molecular), en esta plataforma se ingresó la secuencia de la proteína seleccionada y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 9.

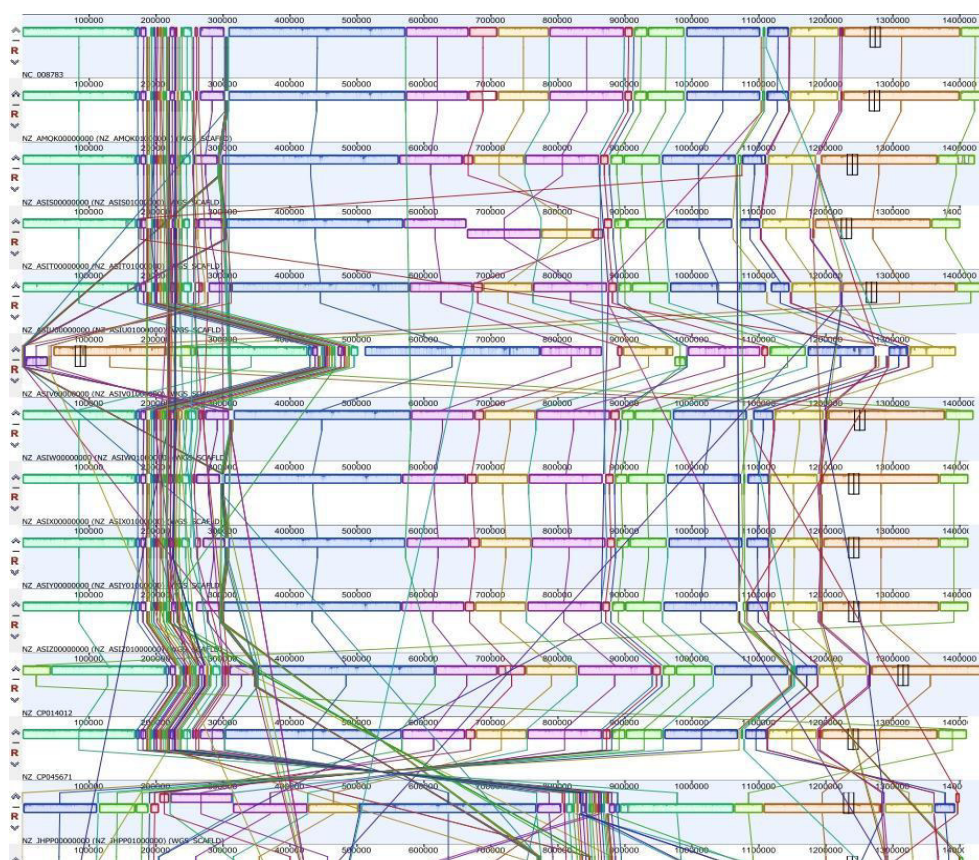


**Figura 4.** Flujo de trabajo para la priorización de blancos moleculares en *B. bacilliformis* USM- LMMB07.

## 6. RESULTADOS

## 6.1. Análisis de las secuencias genómicas de *Bartonella bacilliformis*.

En este análisis bioinformático se alinearon las cepas de *B. bacilliformis* y se encontraron 17 genomas de *B. bacilliformis* reportados en la base de datos del NCBI como se detalla en la Tabla 3, de los cuales 3 genomas están completos; la cepa referencial *B. bacilliformis* KC583, la cepa KC584 y la cepa ATCC 35685, que es la misma cepa KC583. Los 14 genomas restantes se encuentran en el nivel *contigs*.



**Figura 5.** Alineamiento de genomas de *B. bacilliformis* usando Mauve.

En la figura 5 se observa bloques coloreados que representan las regiones homólogas entre los genomas, aquí se alinearon todos los genomas de *B. bacilliformis* secuenciados hasta la fecha (Tabla 3), con la finalidad de buscar nuevos genes con relación a la cepa referencial que fue aislada en 1963; luego de observar, comparar y analizar el alineamiento de los genomas de *B.*

*bacilliformis* se llegó a la conclusión de que no hay genes insertados o nuevos genes, en comparación con la cepa patrón *B. bacilliformis* KC583.

## 6.2. Detección de genes de resistencia en *B. bacilliformis* KC583.

Usando la base de datos PATRIC, se encontraron genes relacionados a la resistencia que se describen en la Tabla 4

Estos genes codifican proteínas relacionadas a la resistencia a macrólidos como MacA/B, además de proteínas que constituyen blancos moleculares de quinolonas como GyrA, GyrB, ParC y ParE, asimismo la proteína RpoB blanco de la rifampicina, en las que se reportan mutaciones puntuales cuando la bacteria se vuelve resistente (Jin y Gross, 1988). También se encontró genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos, *rpsJ1* y *gidB* (metiltransferasa).

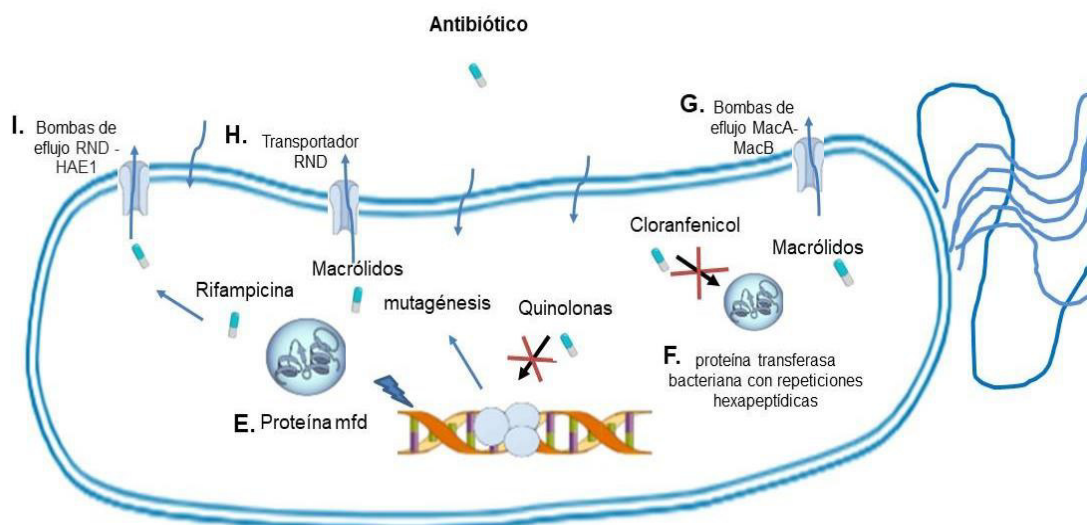
Realizando la búsqueda en GenBank se elaboró un cuadro comparativo de los genes de *B. bacilliformis* asociados al resistoma que se muestran en la Tabla 5, en la cual se muestran ocho genes con una identidad significativa a los genes de otras especies; la proteína putativa MacA Bomba de eflujo (Tabla 6) específica de macrólidos de *B. bacilliformis* KC583 tiene una identidad de 39.71% con la proteína MacA de *Neisseria gonorrhoeae* (Tabla 5), proteína que forma parte de un transportador ABC que exporta macrólidos, como la eritromicina (Rouquette-Loughlin *et al.*, 2005) y un 34% de identidad con la proteína que exporta macrólidos MacA de *E. coli* (Fitzpatrick, *et al.*; 2017).

El transportador ABC tipo eflujo específico de macrólidos MacB de *B. bacilliformis* tiene una identidad de 46% con la proteína MacB de *N. gonorrhoeae*, que también participa en la expulsión de macrólidos (Rouquette-Loughlin *et al.*, 2005). Así mismo el transportador RND de *B. bacilliformis* presenta identidad de 36.38% con la proteína MerX, de *P. aeruginosa* PAO1 que participa en la resistencia a eritromicina, tetraciclina, fluoroquinolona y cloranfenicol (Li *et al.*; 2003).

La predicción *in silico* del porcentaje de identidad de los genes de otras



especies con los genes de *B. bacilliformis* se observa en la Figura 6, como parte del resultado.



**Figura 6.** Predicción *in Silico* de genes y bombas de eflujo involucrados en el mecanismo molecular de resistencia a antibióticos en *Bartonella bacilliformis* (E) Proteína mfd, (F) Proteína transferasa bacteriana con repeticiones hexapeptídicas, (G) Bombas de eflujo MacA y MacB (H) Transportador RND, (I). Bombas de eflujo RND-HAE1.

Según la metodología desarrollada, se utilizó la plataforma CARD, en donde se llegó a identificar dos genes de resistencia en esta base de datos que se describen en la Tabla 6: El gen *gyr B* de resistencia a la coumercina y el gen *gyr A* que confiere resistencia a las quinolonas.

**Tabla 3.** Genomas de *B. bacilliformis* empleados en el estudio.

Cepa	BioSample	Tamaño (Mb)	GC%	Scaffolds	Nivel	Genes	CDS	Año de aislamiento	Localidad
KC583 (ATCC 35685)	SAMN02604047	1.45	38.2	1	Completo	1256	1164	1957	Huarochari- Lima
FDAARGOS_174	SAMN03996253	1.44	38.2	1	Completo	1267	1160	1957	Huarochari- Lima
KC584	SAMN13112075	1.41	38.2	1	Completo	1221	1130	1959	Churcampa-Huancavelica
USM-LMMB 07	SAMN04404356	1.44	38.3	3	Scaffold	1263	1164	2011	Huancabamba-Piura
USM-LMMB 06	SAMN04396912	1.41	38.2	4	Scaffold	1214	1122	2011	Quillabamba-Cuzco
INS	SAMN02470056	1.40	38.2	5	Scaffold	1202	1126	2010	Jaén-Cajamarca
Cond044	SAMN01921139	1.43	38.2	16	Scaffold	1229	1134	1997	Huaylas-Ancash
Ver075	SAMN01921137	1.42	38.2	4	Scaffold	1222	1122	1997	Caraz-Ancash
San Pedro600-02	SAMN02419803	1.41	38.2	4	Scaffold	1211	1121	1997	Caraz-Ancash
Hosp800-02	SAMN01921141	1.39	38.2	20	Scaffold	1182	1102	1997	Caraz-Ancash
CAR600-02	SAMN01921140	1.39	37.6	6	Scaffold	1200	1106	1905	Caraz-Ancash
Heidi Mejia	SAMN02419802	1.41	38.2	11	Contig	1223	1125	1997	Caraz-Ancash
Peru-18	SAMN02419801	1.40	38.2	15	Contig	1222	1124	1998	Cuzco
Ver097	SAMN01921144	1.42	38.3	7	Scaffold	1229	1140	1997	Caraz-Ancash
Peru38	SAMN01921138	1.41	38.2	7	Scaffold	1219	1122	1905	Calca-Cuzco
VAB9028	SAMN01921142	1.40	38.3	4	Scaffold	1203	1110	1984	Tingua-Ancash
CUSCO5	SAMN01921143	1.44	38.3	20	Contig	1268	1169	1998	Urubamba-Cuzco

**Tabla 4.** Genes asociados con la resistencia antimicrobiana en *B. bacilliformis* KC 583 usando PATRIC database.

RefSeq Locus Tag	Gen	Producto	Clasificación	Clase de antibiótico	Pubmed
BARBAKC583_0012	gidB	16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase (EC 2.1.1.170)	gene conferring resistance via absence	aminoglycosides	17238915
BARBAKC583_0619		3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII (EC 2.3.1.179)	antibiotic target in susceptible species	isoniazid, triclosan	10428945
BARBAKC583_0499	fabF	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII (EC 2.3.1.179)	antibiotic target in susceptible species	isoniazid, triclosan	10428945
BARBAKC583_1093	alr	Alanine racemase (EC 5.1.1.1)	antibiotic target in susceptible species	cycloserine	19748470;24303782
BARBAKC583_0515	pgsA	GDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.5)	protein altering cell wall charge conferring antibiotic resistance	peptide antibiotics	22238576
BARBAKC583_0944	ddl	D-alanine--D-alanine ligase (EC 6.3.2.4)	antibiotic target in susceptible species	cycloserine	24303782;24033232
BARBAKC583_0737	gyrA	DNA gyrase subunit A (EC 5.99.1.3)	antibiotic target in susceptible species	fluoroquinolones quinolones quinolines	9293187
BARBAKC583_1346	gyrB	DNA gyrase subunit B (EC 5.99.1.3)	antibiotic target in susceptible species	fluoroquinolones quinolones quinolines, aminocoumarin antibiotics	21693461;2279180;9293187

**Continuación: Tabla 4.** Genes asociados con la resistencia antimicrobiana en *B. bacilliformis* KC 583 usando PATRIC database

RefSeq Locus Tag	Gen	Producto	Clasificación	Clase de antibiótico	Pubmed
BARBAKC583_0571	rpoB	DNA-directed RNA polymerase beta subunit (EC 2.7.7.6)	antibiotic target in susceptible species	rifamycins,peptide antibiotics	3050121;15047531;16723576
BARBAKC583_0572	rpoC	DNA-directed RNA polymerase beta' subunit (EC 2.7.7.6)	antibiotic target in susceptible species	myxopyronins corallopyronins,peptide antibiotics	16723576
BARBAKC583_0925	folA	Dihydrofolate reductase (EC 1.5.1.3)	antibiotic target in susceptible species	diaminopyrimidines	20169085;25288078
BARBAKC583_0396		Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (EC 1.3.1.9)	antibiotic target in susceptible species	isoniazid,ethionamide,triclosan	18193820;10869170;8284673
BARBAKC583_1270		Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (EC 1.3.1.9)	antibiotic target in susceptible species	isoniazid,ethionamide,triclosan	18193820;10869170;8284673
BARBAKC583_0345		Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (EC 3.1.4.46)	protein altering cell wall charge conferring antibiotic resistance	peptide antibiotics	21899450
BARBAKC583_1212	ileS	Isoleucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.5)	antibiotic target in susceptible species	mupirocin	7929087

**Continuación: Tabla 4.** Genes asociados con la resistencia antimicrobiana en *B. bacilliformis* KC 583 usando PATRIC database

RefSeq Locus Tag	Gen	Producto	Clasificación	Clase de antibiótico	Pubmed
BARBAKC583_0713	rplF	LSU ribosomal protein L6p (L9e)	antibiotic target in susceptible species	fusidic acid	19289529;17923494
BARBAKC583_0097	macB	Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB	efflux pump conferring antibiotic resistance	macrolides	11544226
BARBAKC583_0096		Macrolide-specific efflux protein MacA	efflux pump conferring antibiotic resistance	macrolides	11544226
BARBAKC583_0665	rpsJ1	SSU ribosomal protein S10p (S20e)	antibiotic target in susceptible species	tetracyclines, glycylicyclines	26124155

**Tabla 5.** Genes asociados a la resistencia encontrados en *B. bacilliformis*, usando Genbank

<b>Bartonella bacilliformis KC583</b>			<b>Identidad encontrada en otra bacteria</b>			<b>Resistencia</b>	<b>Pubmed</b>
<b>N° acceso</b>	<b>Proteína</b>	<b>N° acceso</b>	<b>Proteína</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Descripción</b>	<b>%</b>	
ABM45448.1	Putativa MacA Bomba de eflujo específica de macrólidos	AAV8598 1.1	MacA	<i>N. gonorrhoeae</i>	MacA es una proteína de fusión de membrana que forma un complejo de eflujo con MacB y TolC.	39.71	Macrólidos 16162665
ABM45448.1	Putativa MacA Bomba de eflujo específica de macrólidos	P75830. 2	Proteína exportadora de macrólidos-MacA	<i>E.coli</i>	Parte del sistema de flujo de salida tripartito MacAB-TolC. MacA estimula la actividad ATPasa de MacB al promover el estado cerrado de ATP de MacB, aumenta la capacidad de MacB para unir macrólidos como la eritromicina y proporciona un enlace físico entre MacB y TolC.	34	Macrólidos 28504659
ABM44873.1	Transportador ABC tipo eflujo específico de macrólidos MacB	AAV8598 2.1	MacB	<i>N. gonorrhoeae,</i>	MacB es un transportador de casete de unión a ATP (ABC) que exporta macrólidos con 14 o 15 lactonas de miembros	46	Macrólidos 16162665
ABM45283.1	Transportador RND	AAG077 63.1	Probable bomba de eflujo. resistencia a división por nodulación(RND)	<i>P. aeruginosa PAO1</i>	MexW es la proteína de membrana tipo RND del complejo de flujo de salida MexVW-OprM .	36.38	Eritromicina, tetraciclina, fluoroquinolona, rifampicina cloranfenicol 12951344

Continuación: **Tabla 5.** Genes asociados a la resistencia encontrados en *B. bacilliformis*, usando Genbank

<b>Bartonella bacilliformis KC583</b>		<b>Identidad encontrada en otra bacteria</b>				<b>Resistencia</b>	<b>Pubmed</b>
<b>N° acceso</b>	<b>Proteína</b>	<b>N° acceso</b>	<b>Proteína</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Descripción</b>	<b>%</b>	
WP_005767386.1	Dihidrofolato reductasa	CAL48457	Putativa resistencia a trimetoprima - Dihidrofolato reductasa.	<i>E. coli</i>	Dfr causa de la resistencia a la trimetoprima.	46.95	Trimetoprima 17307981
ABM45222.1	hexapéptido de transferasa bacteriana	NP_848167	cloranfenicol acetiltransferasa (Plasmido)	<i>Pasteurella multocida.</i>	Gen CatB2 codifica para cloranfenicol acetiltransferasa	41.18	Cloranfenicol 14708986
WP_005766262.1	Traslacional GTPasa TypA	AAV80410	Tet Factor de resistencia a la tetraciclina	<i>Enterococcus faecalis</i>	resistencia a la tetraciclina	44.22	Tetraciclina 15910229
WP_005766719.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	WP_000918667.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [Staphylococcus]	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistencia a Rifampicina	49.74	Rifampicina 9756760

**Tabla 6:** Genes asociados a la resistencia según CARD.

Especie	Acceso	Gen	MUTACIONES	Resistente	Observación	Acceso	Referencia
<i>Bartonella bacilliformis</i> KC 583	aro:3003302	<i>gyrB</i>	G124□S	Coumermicina a1	resistencia natural	PMID: 9797224	Battisti, et al 1998
			R184□Q				
			T214□I				
			T214□A				
<i>Bartonella bacilliformis</i>	aro:3003297	<i>gyrA</i>	D90□G	Fluoroquinolonas	resistencia in vitro	PMID: 12499219	Minnick mf, et al. 2002
			D95□N				

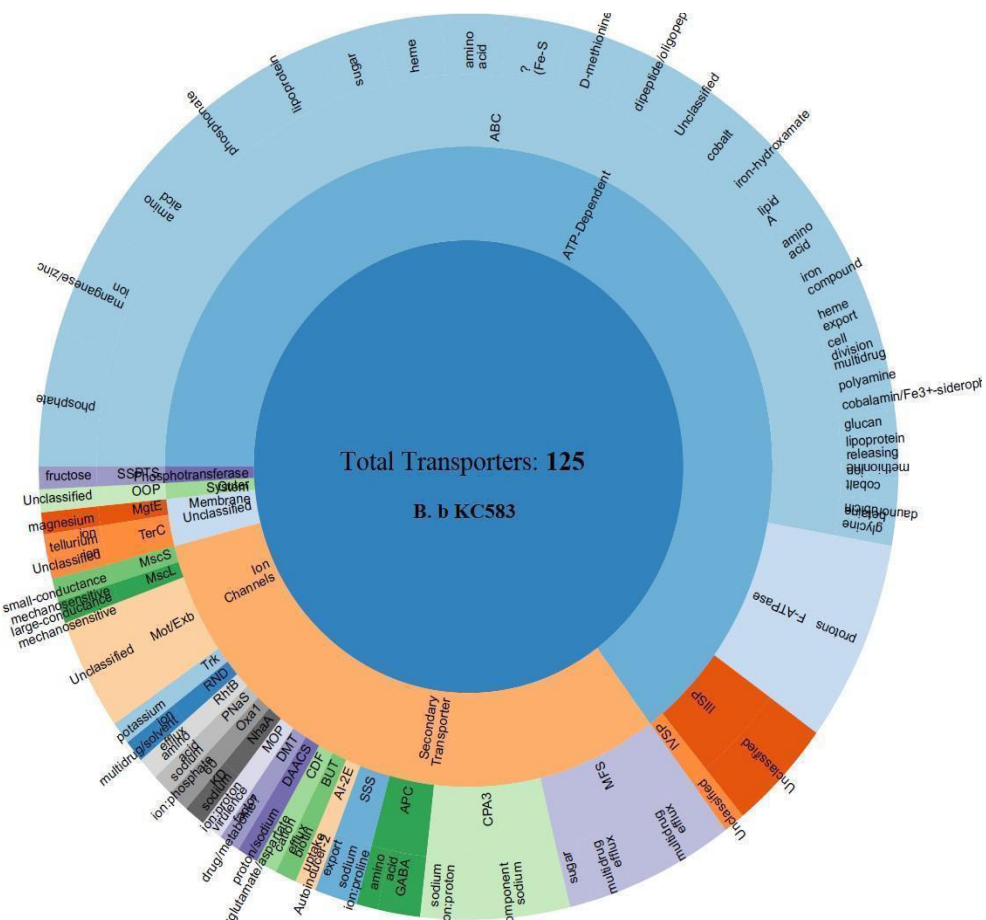


La proteína Factor de transcripción-reparación-acoplamiento de *B. bacilliformis*, presenta un 35.52% de identidad con la proteína Factor de transcripción-reparación-acoplamiento- Mfd, de *S. enterica* serovar Typhimurium la cual presenta resistencia a levofloxacin, ciprofloxacino, rifampicina (Ragheb *et al.*; 2019)

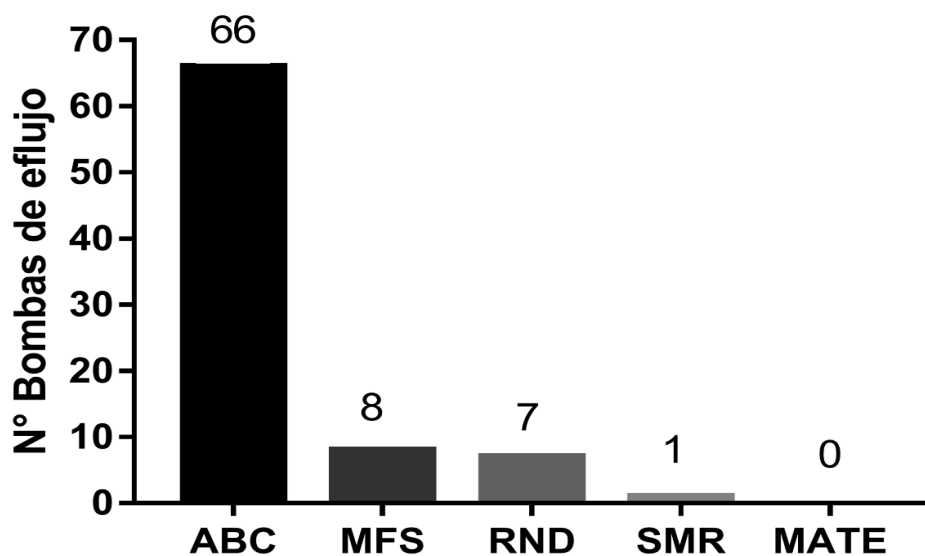
La dihidrofolato reductasa, asociada a la resistencia a trimetoprima de *E. coli* (Grape *et al.*; 2007) tiene 46.95% de identidad a la proteína del mismo nombre de *B. bacilliformis*. Otra proteína, la transferasa bacteriana de hexapéptido de *B. bacilliformis*, tiene un 41.18% de identidad al producto del gen *CatB2*, portado en el plásmido de resistencia a cloranfenicol de *Pasteurella multocida* (Wu *et al.*, 2003). La proteína de unión a GTP TypA de *B. bacilliformis* presenta 44.22% de identidad con la proteína TetT de *Enterococcus faecalis*, que es una proteína que protege al ribosoma de la inhibición de la traducción por acción de la tetraciclina, confiriendo resistencia a este antibiótico (Nishimoto *et al.*; 2006).

### **6.3. Bombas de eflujo de *B. bacilliformis* utilizando plataformas bioinformáticas.**

En la Figura 7, se muestra la clasificación de 125 transportadores de proteínas de *B. bacilliformis*, de las cuales 82 pertenecen a 4 superfamilias de bombas de eflujo: Transportadores ABC, superfamilia facilitadora principal (MFS), la familia pequeña de resistencia a multifármacos (SMR) y la familia de resistencia a división por nodulación (RND). La mayoría son transportadores ABC, seguido de MFS, RND y SMR, (Tabla 7) no habiéndose encontrado transportadores de la superfamilia proteínas de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE). Figura 8



**Figura 7.** Distribución de los transportadores presentes en el genoma de *B. bacilliformis* KC583 usando la base de datos TransportDB (Elbourne *et al.*, 2017).



**Figura 8.** Distribución de las proteínas bombas de eflujo en el genoma *B. Bacilliformis* KC583. En la Tabla 7, se presentan las 82 proteínas bombas de eflujo encontradas en *B. Bacilliformis* KC583.

**Tabla 7.** Bombas de eflujo encontradas en el genoma de *B. bacilliformis* KC583.

Familia de Bombas de eflujo	Código de acceso	Nombre de la proteína	Longitud (número de aminoácidos)
	WP_035453345.1	Proteína de unión al sustrato transportador ABC	325
ABC	WP_005765763.1	Transportador ABC permease	297
ABC	WP_005765901.1	Proteína de unión a ATP transportadora ABC	609
ABC	WP_005766295.1	sn-glicerol-3-fosfato transportador ABC permease UgpE	283
ABC	WP_005766297.1	sn-glicerol-3-fosfato transportador ABC permease UgpA	294
ABC	WP_005766299.1	Sn-glicerol-3-fosfato transportador ABC proteína de unión al sustrato UgpB	441
	WP_005766301.1	proteína de unión al sustrato transportadora ABC de metal	315
ABC	WP_005766303.1	permease transportador ABC de metal	290
ABC	WP_005766305.1	Proteína de unión a ATP transportadora ABC	241
ABC	WP_005766507.1	proteína transportadora de ATP transportadora ABC hemo	264
ABC	WP_005766509.1	permease transportador ABC de hierro	366
ABC	WP_005766511.1	proteína de unión al sustrato transportadora ABC de hemina	303
	WP_005766563.1	Transportador ABC proteína de unión a ATP / permeasa	627
ABC	WP_011807331.1	LPS exportador transportador ABC permease LptG	363
	WP_005766607.1	LPS exportador transportador ABC permease LptF	396
ABC	WP_005766768.1	aminoácido transportador ABC proteína de unión a ATP	259
	WP_005766770.1	Subunidad de permease del transportador ABC	235
ABC	WP_005766771.1	Subunidad de permease del transportador ABC	240
	WP_005766773.1	transportador de aminoácidos ABC	255
ABC	WP_035453066.1	aminoácido transportador ABC proteína de unión a ATP	248
	WP_005766875.1	Subunidad de permease del transportador ABC	238
ABC	WP_005766877.1	aminoácido transportador ABC permeasa	250
	WP_005766879.1	Subunidad de permease del transportador ABC	460
ABC	WP_011807349.1	aminoácido transportador ABC proteína de unión al sustrato	302
ABC	WP_035453066.1	aminoácido transportador ABC proteína de unión a ATP	248
ABC	WP_005766875.1	Subunidad de permease del transportador ABC	238

Continuación: **Tabla 7.** Bombas de eflujo encontradas en el genoma de *B. bacilliformis* KC583

Familia de Bombas de eflujo	Código de acceso	Nombre de la proteína	Longitud (número de aminoácidos)
ABC	WP_005766877.1	aminoácido transportador ABC permeasa	250
ABC	WP_011807349.1	aminoácido transportador ABC proteína de unión al sustrato	302
ABC	WP_005766978.1	glucano transportador ABC proteína de unión a ATP / permeasa	595
ABC	WP_005767093.1	subunidad de permeasa del transportador ABC liberador de lipoproteínas	422
	WP_005767095.1	Proteína de unión a ATP transportadora ABC	226
ABC	WP_005767569.1	Proteína de unión a ATP transportadora ABC	260
ABC	WP_005767571.1	Proteína de unión a ATP transportadora ABC	291
ABC	WP_005767573.1	Transportador ABC permease	309
ABC	WP_005767576.1	Transportador ABC permease	357
ABC	WP_005767578.1	Proteína de unión al sustrato transportador ABC	534
ABC	WP_005767694.1	Proteína de unión al sustrato transportador ABC de la familia MetQ / NlpA	272
ABC	WP_005767698.1	Transportador ABC permease	219
	WP_005767710.1	proteína de unión a sustrato transportadora ABC de sideróforo	306
ABC	WP_005767713.1	permease transportador ABC de hierro	318
	WP_005767715.1	permeasa del transportador de enterobactina ABC	316
ABC	WP_080512689.1	proteína transportadora de fosfato transportador ABC ATP	260
ABC	WP_005767927.1	fosfato transportador ABC permease PtsA	430
ABC	WP_011807429.1	fosfato transportador ABC permease subunidad PstC	486
	WP_005767934.1	proteína transportadora de sustrato transportadora ABC de fosfonato	348
ABC	WP_005767941.1	Proteína de unión a ATP transportadora ABC	240
ABC	WP_005768040.1	hemo ABC exportador de proteína de unión a ATP CcmA	208
ABC	WP_011807442.1	hemo transportador ABC permease	259
	WP_005768088.1	permease transportador ABC de metal	301
ABC	WP_005768090.1	permease transportador ABC de metal	285
	WP_005768092.1	proteína transportadora de ATP de manganeso / hierro ABC transportador	280
ABC	WP_005768094.1	proteína de unión al sustrato transportadora ABC de metal	302
	WP_005768187.1	Exportador de LPS ABC transportador ATP proteína de unión	264
ABC	WP_005768189.1	proteína transportadora de sustrato transportadora ABC de azúcar	200

Continuación: **Tabla 7.** Bomba de eflujo encontradas en el genoma de *B. bacilliformis* KC583

Familia de Bombas de eflujo	Código de acceso	Nombre de la proteína	Longitud (número de aminoácidos)
ABC	WP_005768191.1	Exportador LPS ABC transportador de proteína periplásmica LptC	214
ABC	WP_005765764.1	Proteína que contiene el dominio de cassette de unión a ATP	264
ABC	WP_005765850.1	Subunidad de bomba de eflujo de la familia MacB	668
ABC	WP_005765852.1	proteína hipotética	324
ABC	WP_005765853.1	división celular proteína de unión a ATP	219
ABC	WP_005765960.1	FtsE Cassette de unión a ATP que contiene dominio	606
ABC	WP_005766292.1	Sn-glicerol-3-fosfato de importación de proteína de unión a ATP UgpC	345
ABC	WP_005767122.1	Proteína de ensamblaje de clúster Fe-S	503
ABC	WP_005767696.1	SufB proteína de unión a ATP transportadora ABC de metionina	344
ABC	WP_005768130.1	Proteína que contiene el dominio de cassette de unión a ATP	588
ABC	WP_005767124.1	Conjunto de clúster Fe-S ATPase SufC	251
ABC	WP_005767717.1	proteína transportadora de ATP transportadora ABC de hierro	252
MFS	WP_011807254.1	Transportador MFS	539
MFS	WP_005767012.1	Transportador MFS	474
MFS	WP_005767272.1	Transportador MFS	417
MFS	WP_005767317.1	Transportador MFS	402
MFS	WP_005767390.1	Transportador MFS	435
MFS	WP_005767469.1	resistencia a la tetraciclina bomba de eflujo MFS	406
MFS	WP_005767666.1	Transportador MFS	525
MFS	WP_005767294.1	proteína de membrana	317
RND	WP_005765849.1	subunidad del adaptador periplásmico del transportador RND de eflujo	399
RND	WP_005766207.1	subunidad del adaptador periplásmico del transportador RND de eflujo	378
RND	WP_005767548.1	transportador de cationes	302
RND	ABM45066	Transportador	405
RND	WP_011807348	type_I_sec_TolC	428
RND	WP_005765850.1	Subunidad de bomba de eflujo de la familia MacB	668
RND	WP_005766209.1	Proteína de la familia AcrB / AcrD / AcrF	1044

#### **6.4. Predicción de proteínas drogables de *B. bacilliformis* USM- LMMB07.**

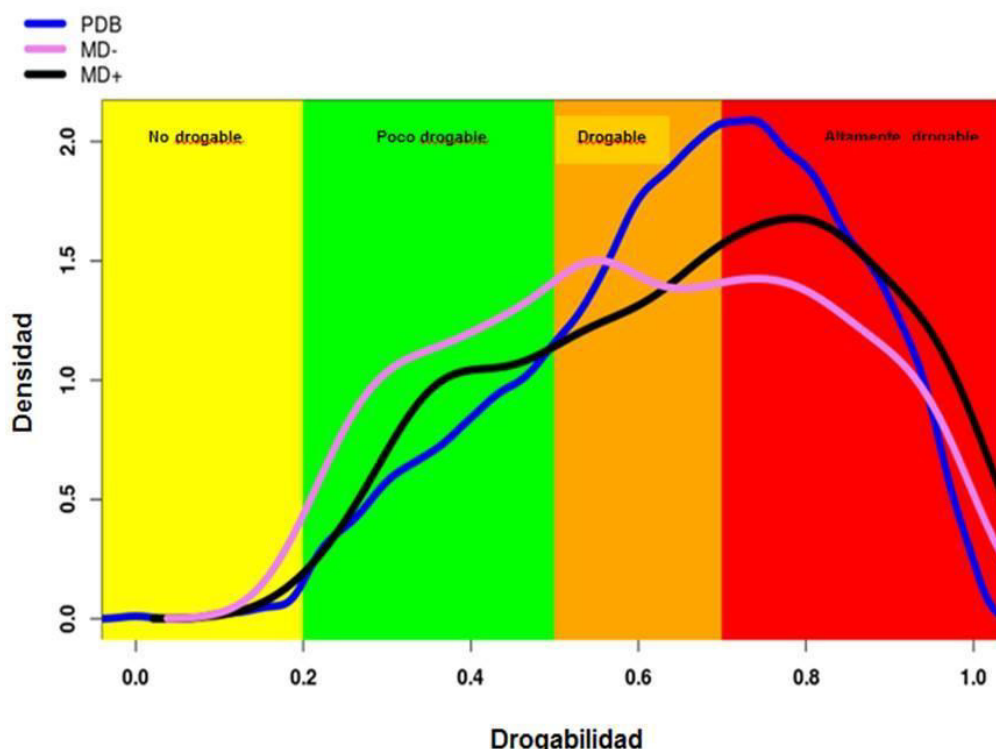
Para la predicción de proteínas blanco de drogas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 se obtuvieron los siguientes resultados:

##### **6.4.1. *B. bacilliformis* USM- LMMB07 presenta estructuras proteicas con cavidades drogables.**

El análisis clasificó todas las estructuras de dominio obtenidas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07, de acuerdo con su drogabilidad estructural. Para este propósito los dominios estructurales se agruparon en dos categorías, considerando solo los modelos estructurales obtenidos del esquema de trabajo, ya que el Protein Data Bank (PDB) no presenta ninguna información sobre proteínas cristalizadas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07.

Los resultados muestran que la mayoría de las proteínas del grupo MD + (casi el 70%) tienen puntuaciones de DS superiores a 0,5 (Tabla 8). Así, de acuerdo con trabajos anteriores (De Felipe *et al.*; 2016, Ramos, *et al.*; 2018) el método puede predecir en un alto grado la probabilidad de que una proteína albergue un compuesto similar a un fármaco.

El primer grupo de interés, donde se pueden encontrar dianas novedosas, se refiere al grupo MD + -HD (que incluye proteínas en el grupo MD + y también son altamente drogables), como se observa en la figura 9.



**Figura 9.** histograma de la puntuación de la drogabilidad (DS) para *B. bacilliformis* USM-LMMB07.

En la Figura 9 se observa las curvas que grafican las estructuras del PDB cuando se unen a un inhibidor o fármaco (línea azul), sólo las estructuras modeladas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 a partir de estructuras proteicas cristalizadas sin la presencia de un fármaco o inhibidor (línea rosa) y solo estructuras modeladas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 se representan de estructuras proteicas cristalizadas con un fármaco o inhibidor (línea negra). Teniendo en cuenta la distribución de la puntuación (DS) de las cavidades de proteínas que contienen un compuesto similar a un fármaco en el PDB, las cavidades se clasificaron en cuatro categorías: no drogable ( $0,0 \leq DS < 0,2$ ), poco drogable ( $0,2 \leq DS < 0,5$ ), drogable ( $0,5 \leq DS < 0,7$ ) y altamente drogable ( $0,7 \leq DS \leq 1,0$ ). Las curvas de esta figura describen una función de densidad en la que las curvas se ajustan a un histograma de frecuencia. Es importante señalar que en ningún caso el puntaje de drogabilidad es menor que 0 ni mayor que 1.

En la tabla 8, se observa MD + (estructuras modeladas a partir de proteínas cristalizadas con un inhibidor o fármaco) y MD- (estructuras modeladas a partir

de proteínas cristalizadas sin inhibidor ni fármaco)

**Tabla 8.** Proteínas de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 clasificadas según la puntuación de drogabilidad (DS).

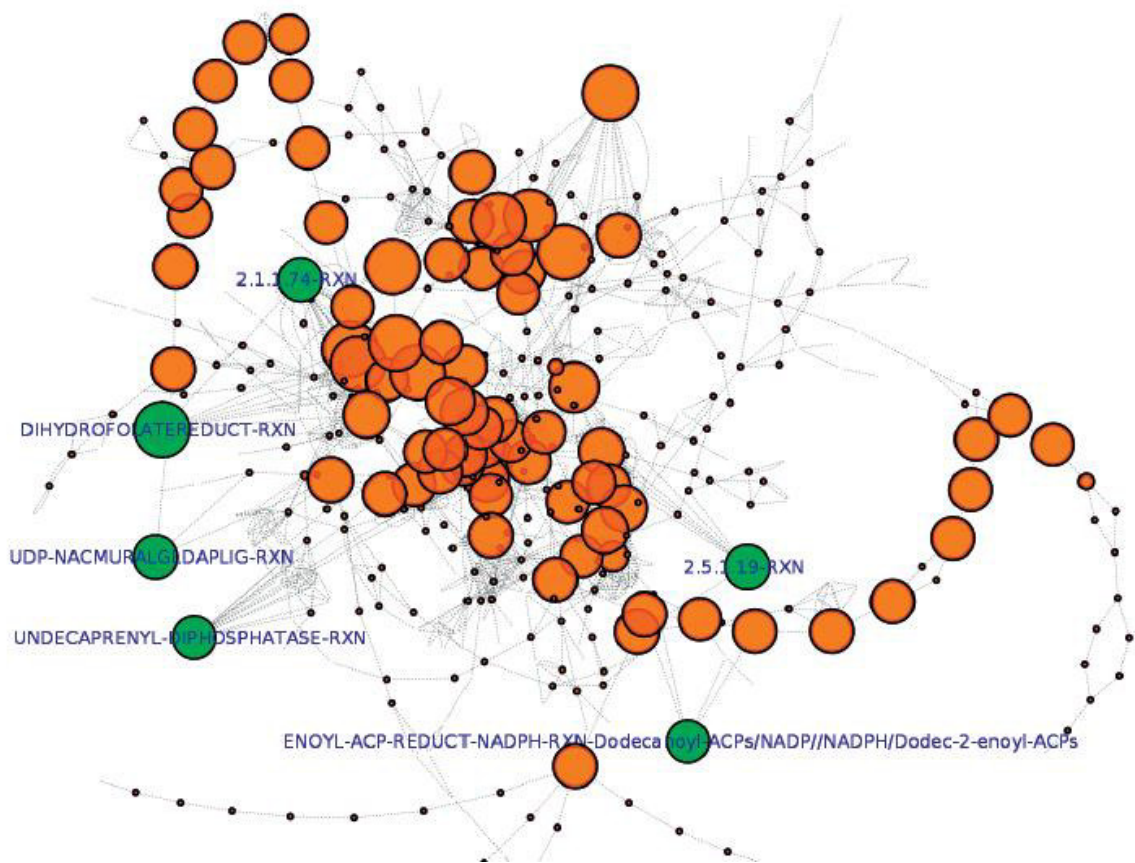
	<b>MD+</b>	<b>MD-</b>	<b>TOTAL</b>
No drogable	18 (7.46%)	96 (14.97%)	114
Poco drogable	55 (22.82%)	181 (28.23%)	236
Drogable	58 (24.04%)	159 (24.81%)	217
Altamente drogable	110 (45.64%)	205 (31.98%)	315
<b>TOTAL</b>	<b>241</b>	<b>641</b>	<b>882</b>

#### 6.4.2. Reconstrucción de la red metabólica de *B. bacilliformis* USM-LMMB07.

En la reconstrucción de la red metabólica de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 a partir de la anotación de su genoma completo dio como resultado un total de 898 reacciones (885 catalizadas por enzimas y 13 de transporte). En este sentido dichas reacciones enzimáticas se encuentran distribuidas formando parte de 148 vías metabólicas, las cuales, agrupan 1143 proteínas. (Figura 10).

La presencia de pocos nodos de alta centralidad indica que estos centros pueden ser de especial importancia para la cohesión de la red. En este sentido, se identificaron 80 reacciones con un grado de centralidad alto ( $>0.1$ ), de las que formaban parte 60 proteínas. Por otra parte, también se identificó reacciones choke-points en la red metabólica de *B. bacilliformis* USM-LMMB07, es decir, reacciones que consumen de forma única o producen un compuesto dado.





**Figura 10:** Red metabólica de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 representada como un gráfico de reacción. Los nodos representan reacciones en la red, y hay un borde entre dos nodos cuando el producto de una reacción se usa como sustrato en la siguiente reacción. El tamaño del nodo es proporcional a la centralidad de intermediación, y los números de acceso de MetaCyc (<http://metacyc.org>) se muestran para las reacciones centrales que involucran las últimas seis proteínas prioritarias.

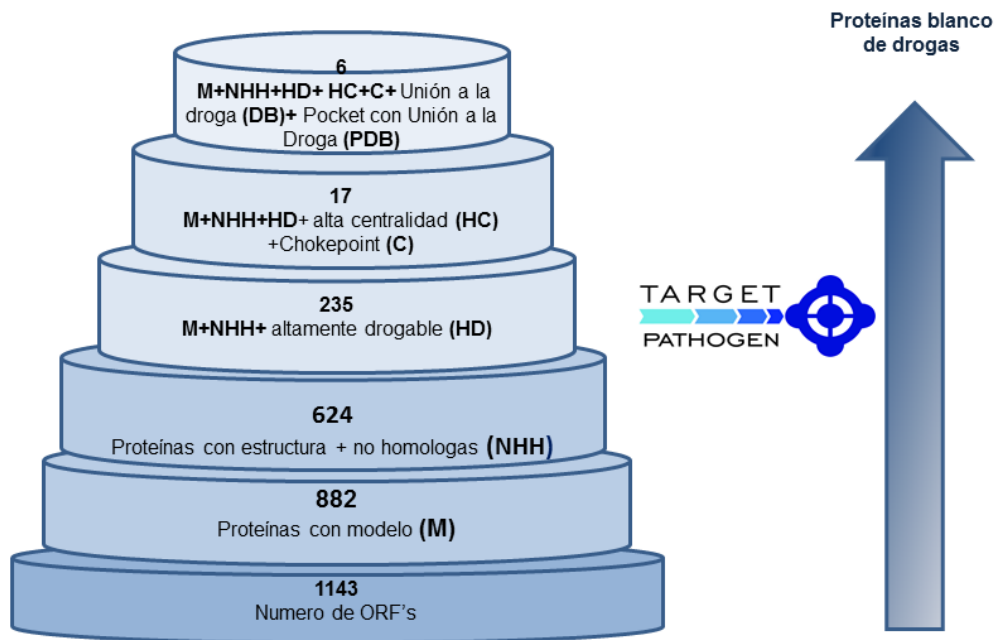
Un total de 223 reacciones se clasificaron como choke-points (puntos de estrangulamiento) de consumo, mientras que 50 reacciones fueron puntos de choke-points de producción. Además, 16 reacciones se clasifican como reacciones de doble choke-points (tanto de consumo como de producción). El bloqueo de las reacciones de punto de estrangulamiento puede provocar la falta de producción de metabolitos esenciales o la acumulación de compuestos potencialmente tóxicos en la célula; por lo tanto, este tipo de reacciones tienen una gran importancia en la focalización de fármacos.

### **6.4.3. Integración de datos metabólicos, drogabilidad y criterio off *Target*, permiten identificar y priorizar posibles dianas moleculares en el desarrollo de fármacos contra *B. bacilliformis*.**

Todos los datos previamente calculados se integraron en Target-Pathogen (Sosa *et al.*, 2018) para obtener un conjunto de proteínas que cumplan diferentes características que las hagan atractivas para proyectos de descubrimiento de fármacos, como la drogabilidad estructural, *off-Target*, esencialidad y el papel metabólico, se aplicó varios filtros (Figura 11). En primer lugar, se descartaron todas aquellas proteínas para las que no se pudo obtener un modelo estructural representativo; sólo 882 de las 1143 proteínas que componen el proteoma *B. bacilliformis* USM-LMMB07 cumplieron este requisito. Posteriormente, se descartaron proteínas con homólogos cercanos al genoma humano y al menos un tercio de los genomas del microbioma intestinal para minimizar las posibilidades de interferencia cruzada (y toxicidad) de un fármaco con proteínas del huésped humano. Luego, se filtraron todas aquellas proteínas que no eran altamente drogables ( $DS < 0,7$ ) y se conservaron 235 proteínas altamente drogables sin homólogos cercanos al genoma humano y su microbioma. Luego, se filtró aún más estas proteínas teniendo en cuenta su importancia desde el punto de vista metabólico. En este sentido, solo mantuvimos aquellas proteínas involucradas en reacciones de alta centralidad y punto de estrangulamiento. Las 17 proteínas resultantes (Tabla 9) albergan un alto potencial para dirigirse a fármacos.

Por último, se prestó especial atención a aquellas proteínas para las que existe al menos una estructura cristalina, de otra proteína del mismo dominio PFAM que se cristalizó en presencia de un inhibidor o compuesto de tipo fármaco. Las proteínas de este grupo tienen incluso más probabilidades de ser farmacológicas, por un criterio de asociación (existe una proteína de la misma familia de PFAM que se cocrystalizó con fármacos) y un criterio estructural ( $DS > 0,7$ ) coinciden. Además, en seis (FabI, FoliA, AroA, TrmFO, UppP, MurE) de un total de siete proteínas que cumplen estos criterios, la cavidad drogable predicha se superpone con el sitio donde el fármaco se une a la proteína en la estructura

cocrystalizada. En la Tabla 10 se muestran las seis proteínas que cumplen todos los criterios descritos anteriormente y por tanto son atractivos para ser utilizados como objetivos en el desarrollo de fármacos contra *B. bacilliformis* USM-LMMB07.



**Figura 11.** Esquema general del proceso de priorización en *B. bacilliformis* USM-LMMB07 utilizando filtros Target-Pathogen.

**Tabla 9.** Proteínas blancos de drogas priorizadas de *B. bacilliformis* USM- LMMB07 utilizando la plataforma Target Pathogen.

Locus tag	Gen	Producto del Gen	DS*	Human off target	Gut microb.	C*	Chk*	DB*	PB*
AWH67_RS01355	<i>rdgB</i>	Pirofosfatasa NTP de purina no canónica	0.93	0.72	1	0.97	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS04105	<i>folA</i>	Dihidrofolato reductasa	0.97	0.68	21	0.96	Verdadero	Verdadero	Verdadero
AWH67_RS00185	<i>maf2</i>	Proteína de formación de septum	0.85	0.64	12	0.97	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS04665	<i>purB</i>	adenilosuccinato liasa	0.86	0.73	51	0.77	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS05475	-----	beta-cetoacil-ACP sintasa II	0.97	1	0	0.21	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS03970	<i>murE</i>	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamato - 2, 6-diaminopimelato ligasa	0.95	1	0	0.2	Verdadero	Verdadero	Verdadero
AWH67_RS05335	<i>fabZ</i>	beta-hidroxiacil-ACP deshidratasa	0.92	1	22	0.19	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS05565	<i>fabH</i>	3-oxoacil-ACP sintasa III	0.89	1	67	0.21	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS01510	<i>aroA</i>	3-fosfosiquimato carboxiviniltransferasa 1-	0.78	1	23	0.27	Verdader	Verdadero	Verdadero

Continuación: **Tabla 9.** Proteínas blanco de drogas priorizadas de *B. bacilliformis* USM- LMMB07 utilizando la plataforma Target Pathogen.

Locus tag	Gen	Producto del Gen	DS*	Human off target	Gut microb.	C*	Chk*	DB*	PB*
AWH67_RS02160	<i>trmFO</i>	FADH <sub>2</sub> (2) -oxidante metilentetrahidrofolato –	0.75	1	72	0.2	Verdadero	Verdadero	Verdadero
AWH67_RS02410	<i>uppP</i>	tRNA- (uracilo (54) -C (5)) - metiltransferasa TrmFO undecaprenil-difosfatasa undecaprenil difosfato-	0.74	1	3	0.12	Verdadero	Verdadero	Verdadero
AWH67_RS03995	<i>murG</i>	muramoilpentapéptido beta-N-acetilglucosaminiltransferasa	0.73	1	0	0.12	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS01650	<i>fabI</i>	enoil- [acil-carrier-protein] reductase	0.99	0.71	16	0.1	Verdadero	Verdadero	Verdadero
AWH67_RS04685	<i>purQ</i>	subunidad de la fosforibosilformilglicinamida sintasa	0.89	0.75	40	0.1	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS01345	<i>dapE</i>	succinil-diaminopimelato desuccinilasa	0.75	0.78	11	0.2	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS04690	<i>purL</i>	subunidad de la fosforibosilformilglicinamida sintasa	0.79	0.77	39	0.1	Verdadero	Falso	Falso
AWH67_RS02870	<i>fabI</i>	enoil- [acil-carrier-protein] reductasa	0.77	0.73	16	0.1	Verdadero	Falso	Falso

\*

C: Centralidad  
ChK: Chockepoint.

Human off target: Proteínas humanas fuera de objetivo. DB: Unión a la droga.  
PB: Pocket con unión a la droga. DS: Score de drogabilidad.

## 6.5. Caracterización de las proteínas blanco de drogas para *B. bacilliformis* USM- LMMB07.

En los resultados obtenidos se encontraron 6 proteínas altamente drogables, no tienen homólogos cercanos en el genoma humano y son relevantes desde el punto de vista metabólico.

Para caracterizar aún más estas proteínas, se analizó su esencialidad, ontología (función molecular y los procesos biológicos que realizan), localización subcelular, punto isoelectrico y peso molecular. Ver Tabla 10.

Así Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductasa FabI (enoyl-ACP reductase), presente en la membrana citoplasmática, ejerce actividad catalítica y desarrolla procesos de biosíntesis de ácidos grasos en la bacteria, y por su función biológica ha sido estudiada en varias especies. En el análisis de homología por BLASTP y con la base de datos DEG, se observó que esta proteína presenta un alto índice de identidad, de 60% con la proteína esencial de *Sphingomonas wittichii* RW1 (Roggo *et al.*, 2013) y de 52.89% de identidad con la proteína de *Caulobacter crescentus* (Christen *et al.*, 2011), También esta proteína es esencial en muchas otras bacterias como *E. coli* y *M. tuberculosis*. (Heath, 1998) En este sentido, es probable que fabI también sea esencial, ya que las funciones codificadas por genes esenciales se conservan ampliamente en los microorganismos.

La Dihidrofolato reductasa (DHFR) FolaA, es una proteína que tiene actividad de unión al NADP, el análisis en PSORTb revela que esta proteína está presente en el citoplasma y participa en el metabolismo de drogas, en el proceso biosintético de amida y tetrahidrofolato; el análisis de homología mediante BLASTP contra la base de datos DEG de dicha proteína indica que hay genes esenciales, homólogos a folA de *B. bacilliformis* (identidad > 40% y valor E = 1,14e-41), presente en más de diez organismos diferentes, como *Caulobacter crescentus* y *P. aeruginosa*, por lo que podría inferirse la esencialidad para el

desarrollo/supervivencia de *B. bacilliformis* USM- LMMB07.

La 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase- AroA, es otra de las proteínas encontradas en este estudio; está localizada en el citoplasma de *B. bacilliformis* USM- LMMB07, con función transferasa, interviene en procesos biológicos tales como biosíntesis de la familia de aminoácidos aromáticos y proceso biosintético del corismato; el análisis de homología por BLASTP con la base de datos DEG de esa proteína, indica una identidad de 53.3% respecto a la proteína esencial de *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (Pechter *et al.*, 2016) y de 50.9% de identidad con la proteína esencial de *Caulobacter crescentus* (Christen *et al.*, 2011), en ambas bacterias son proteínas esenciales, por lo que se deduce, que esta proteína sería esencial para *B. bacilliformis* USM- LMMB07.

La proteína FADH(2)-oxidizing methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C(5))-methyltransferase (TrmFO), con un tamaño de 464 aminoácidos se localiza en el citoplasma, que está involucrada en el procesamiento de tRNA, desarrolla funciones moleculares como la actividad methyltransferase y participa en la unión del dinucleótido flavina adenina, es una proteína altamente drogable con un índice de 0.746 de drogabilidad; sin embargo en el análisis de homología por BLASTP con la base de dato DEG, indica una identidad de 48% con la proteína esencial de *Staphylococcus aureus* N315(Ji *et al.*, 2001) y por debajo de 35% de identidad con las proteínas esenciales de otras bacterias, por lo que se infiere que a pesar de tener un índice de drogabilidad superior a 0.7 y tener excelentes resultados con nuestros análisis, es preciso desarrollar estudios In vitro, para observar la esencialidad en *B. bacilliformis* USM- LMMB07.

Undecaprenyl-diphosphatase- UppP, es una proteína integral que presenta función catalítica y se encuentra localizada en la membrana citoplasmática de *B. bacilliformis* USM- LMMB07; el análisis de homología con BLASTP y con la base de datos DEG, presentó un 36.49% de identidad con la proteína de *Helicobacter pylori* 26695 (Salama *et al.*, 2004), al igual que en *Haemophilus influenzae* Rd KW20 presenta una identidad de 30.76% (Akerley *et al.*, 2002), por lo que se necesitaría de análisis in vitro para observar la esencialidad en *B.*

*bacilliformis* USM- LMMB07.

UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase-MurE, fue encontrada en nuestros análisis y está localizada en el citoplasma, realiza funciones de unión al ion magnesio, unión al ATP, tiene actividad ligasa, y en los procesos biológicos de la bacteria participa en el ciclo celular, proceso biosintético de peptidoglucano, división celular y en la organización de la pared celular (Tabla 10) ,además al realizar el análisis de homología por BLASTp y con la base DEG; se observa que presenta identidad superior a 50% con las proteínas esenciales de *Agrobacterium fabrum* str.C58 (Akerley *et al*, 2014) y *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (Pechter *et al.*, 2016), por lo que se infiere podría ser esencial para la sobrevivencia de esta especie de *Bartonella*.



**Tabla 10.** Caracterización de las proteínas blanco de drogas para *B. bacilliformis* USM- LMMB07.

Gen	Descripción	Pi*	Mw**	Localización subcelular	Función molecular	Proceso biológico
<i>FabI</i>	enoyl-[acyl carrier-protein] reductase	5.78	29368.63	Membrana citoplasmática	Actividad de unión NADP	Proceso de biosíntesis de ácidos grasos  Proceso metabólico de un carbono. Proceso biosintético del nucleótido.
<i>FolA</i>	dihydrofolate reductase	6.59	18799.5	Citoplasma	Actividad transferasa	Metabolismo de las drogas neurotransmisor. proceso biosintético de amida y de tetrahidrofolato.
<i>AroA</i>	3-phosphoshikimate carboxyvinyltransferase	8.50	47559.16	Citoplasma	Actividad Methyltransferase Unión flavin adenine dinucleotide	Forma parte de los procesos de la Familia de aminoácidos aromáticos, del proceso biosintético del corismato.
<i>TrmFO</i>	FADH(2)-oxidizing methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C(5))-methyltransferase	7.21	51693.32	Citoplasma	Actividad catalítica	tRNA Procesamiento
<i>UppP</i>	undecaprenyl-diphosphatase	9.2	22650.04	membrana Citoplasmatica	Unión Vinculante drogas. Actividad de la ligasa	Componente membrana.
<i>MurE</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2, 6 -diaminopimelate ligase	6.51	52537.89	Citoplasma	Actividad de unión NADP	Ciclo celular, regulación de la forma celular, proceso biosintético del peptidoglicano, división celular y organización de la pared celular

## 7. DISCUSIÓN

Los genomas de *Bartonella bacilliformis* analizados tienen alta similaridad y se demuestra que no presentan muchos cambios en sus genes.

*B. bacilliformis* tiene tratamiento en sus formas aguda no grave, crónica eruptiva y aguda grave, según el esquema del MINSA (Minsa, 2007) (Tabla 1), presenta cepas circulantes que han adquirido resistencia antimicrobiana (Quispe, 2009; Espinoza-Culupú *et al.*, 2014, Mendoza-Mujica y Flores-León, 2015); por ello se analizó los genes involucrados en la resistencia. Algunas cepas de *Bartonella* presentan susceptibilidad a cada antibiótico, en áreas endémicas, esto se vio reflejado en sus tasas de letalidad (Arroyo, 2008).

En el análisis del alineamiento de los genomas de *B. bacilliformis*, se evidencio que no existen nuevos genes; pero si hay mutaciones e inserciones puntuales (Figura 5), estos resultados son parciales debido a que los genomas de *B. bacilliformis*, en su mayoría no están completos.

Además, en el análisis del resistoma de *B. bacilliformis* KC583, se encontró proteínas relacionadas a la resistencia a macrólidos en las bases de datos PATRIC y GenBank (Tablas 4 y 5). Los macrólidos como la azitromicina y eritromicina son antibióticos utilizados en la fase crónica eruptiva de la EC. Dichas proteínas encontradas, como el transportador ABC tipo eflujo específico de macrólidos MacB, la bomba de eflujo putativa MacA específica de macrólidos, la MacB permeasa de unión a ATP- que exporta macrólidos y el transportador RND, son bombas de eflujo pertenecientes a la familia ABC y a la familia RND respectivamente, que se encontraron presentes en el genoma de *B. bacilliformis* KC583 (Tabla 6). Estas bombas de eflujo han sido encontradas con una identidad mayor o igual al 34%, con proteínas que presentan resistencia a los macrólidos para otros géneros bacterianos entre ellos *Neisseria gonorrhoeae* (Yum *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (Kobayashi *et al.* 2001, Xu *et al.* 2010) y *Salmonella* (Bogomolnaya *et al.*, 2013). Investigaciones *in silico*, muestran resultados similares encontrados en

*Bartonella* (Biswas *et al.*, 2008) y en *E. coli* (Paulsen *et al.*, 1998). En esta última bacteria se encontraron bombas de eflujo denominadas MacAB (Kobayashi *et al.*, 2001), que son de tipo ABC específico para macrólidos, donde se clonaron todos estos ORF en plásmidos multicopia y se investigó su relación con la resistencia a estas drogas, encontrando que ambos genes son necesarios para generar resistencia a macrólidos. En cepas de *B. bacilliformis* relacionadas a este tipo de resistencia, se reportó mutantes *in vitro*, obtenidas luego de varios pasajes con eritromicina (Gomes *et al.*, 2016). Otros trabajos demostraron que los macrólidos interfieren con el ensamblaje de los ribosomas en varias especies bacterianas (Chittum y Champney, 1995; Champney, 2001), pues el sitio de unión a macrólidos puede ser modificado por mutaciones en los genes *rplD* y *rplV*, que codifican proteínas ribosomales L4 y L22, respectivamente. Las mutaciones en L4 y L22 son cada vez más y se identifican en especies clínicamente relevantes, tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* (Peric *et al.*, 2003; Franceschi *et al.*, 2004). Estas mutaciones son diversas e incluyen mutaciones sin sentido, inserciones y deleciones, al igual que los trabajos de Diner y Hayes (2009), quienes encontraron mutaciones en proteínas ribosómicas L4 y L22 que confieren resistencia a los macrólidos como eritromicina, las cuales eran complejas e involucran múltiples mutaciones sin sentido, eliminaciones en marco e inserciones. Los autores encontraron 341 mutaciones de resistencia en 278 proteínas tipo L4 y L22 de *E. coli* (Diner y Hayes, 2009). Una de las mutaciones encontradas con más frecuencia fue la de la posición Q62 que resultó en Q62F en las proteínas L4; esta mutación se identificó en casi el 50% de la proteína ribosomal L4 de mutantes seleccionados con eritromicina. Esto nos indicaría la plasticidad de las proteínas L4 y L22 para presentar mutaciones con facilidad (Diner y Hayes, 2009). Por otro lado, en la cepa *B. bacilliformis*-USM-LMMB-005 de Huancabamba-Piura, Perú, se determinó que existían mutaciones nucleotídicas muy cercanas a la zona determinante de resistencia a eritromicina, que podrían estar asociadas a la resistencia al antibiótico (Espinoza -Culupú, 2014). Con la evidencia de estudios anteriores, realizados *in vitro*, sumado a los resultados obtenidos en este trabajo respecto al porcentaje de identidad de proteínas que presentan resistencia en otras

bacterias a macrólidos como azitromicina y eritromicina, además de las bombas de eflujo predichas en *B. bacilliformis* KC583, se puede inferir que hay una alta probabilidad de que esta especie presente resistencia frente a los macrólidos.

Cloranfenicol es otro de los antibióticos que se indican en el esquema de tratamiento para *B. bacilliformis* (Tabla 1). En el análisis se encontró que el Gen *catb2* que codifica para cloranfenicol acetiltransferasa de *Pasteurella multocida* (Tabla 5), está relacionada a la resistencia al cloranfenicol (Wu *et al.*, 2003) y presenta 41.18% de identidad con la proteína transferasa bacteriana con repeticiones hexapeptídicas de *B. bacilliformis* KC583. Este gen ha sido reportado también en *E coli* y es responsable de la resistencia intrínseca a una amplia gama de compuestos, incluidos los medicamentos lipofílicos, detergentes y colorantes (Kobayashi *et al.*, 2001) El gen *cat* confiere resistencia al cloranfenicol porque codifica una enzima llamada cloranfenicol acetiltransferasa que lo inactiva (Shaw, 1983), estudios *in silico* muestran que *Bartonella sp* presenta el gen de resistencia a cloranfenicol (Biswas *et al.*, 2008). Otros trabajos muestran la respuesta a los tratamientos con cloranfenicol en cepas como *Streptococcus pneumoniae* (Champney, 2001), *Bacillus subtilis* (Chittum y Champney, 1995), *Yersinia pestis* (Qiu *et al.*, 2006) y *Enterococcus faecalis* (Franceschi *et al.*, 2004), en donde este antibiótico provoca estrés oxidativo en bacterias sensibles (Qiu *et al.*, 2006; Aakra *et al.*, 2010), en el caso de *B. bacilliformis*, expuesta a cloranfenicol *in vitro*, después de varios pasajes, presentó resistencia fenotípica, demostrado mediante ensayos con la cepa 57.20ChI-40 (sin halo de inhibición), mientras que la cepa 57.18ChI-40 permaneció con un halo de inhibición de 18 mm (Gomes *et al.*, 2016). En cepas clínicas de *B. bacilliformis* aisladas de Áncash - Perú, se encontró que el 1% de un total de 100 presentaron resistencia a cloranfenicol en las diferentes pruebas de sensibilidad antimicrobiana como E-test, dilución en agar y disco difusión (Mendoza y Flores, 2015) estos datos encontrados en la literatura de cepas de *B. bacilliformis* resistentes a cloranfenicol, demuestran que existe resistencia fenotípica de algunas cepas, y que esto se debería a que la proteína transferasa bacteriana con repeticiones hexapeptídicas de *B. bacilliformis*, presenta similitud con el gen *catB2* de *Pasteurella multocida* (Tabla 5) lo que

explicaría la rápida adquisición de resistencia a cloranfenicol y la falla terapéutica en el tratamiento de la EC.

Entre las quinolonas utilizadas en el tratamiento de la EC, desde el 2001 (Maguiña *et al.*, 2001), tenemos a ciprofloxacina (Tabla 1). Los mecanismos de resistencia de las quinolonas han sido estudiados en *E. coli* (Cattoir *et al.*, 2008). Desde los años 1957, se han encontrado cepas de *B. bacilliformis* que presentan resistencia constitutiva a las quinolonas, que está relacionada a la presencia de alanina en posición 91 y 85 de las dianas de las quinolonas GyrA y ParC, respectivamente (Ruiz, 2003, del Valle *et al.*, 2010). Al analizar el resistoma de *B. bacilliformis* KC583 se encontraron mutaciones puntuales, ya reportadas, en las siguientes proteínas: subunidad A de la DNA girasa (GyrA), subunidad B de la DNA girasa (GyrB), subunidad A de la topoisomerasa IV (ParC) y subunidad B de la topoisomerasa IV (ParE), que le confieren resistencia a las quinolonas (Espinoza-Culupú, 2014; Espinoza-Culupú *et al.*, 2014). También se encontró el gen *mfd* (Factor de acoplamiento de reparación de transcripción) (Tabla 5), que presenta una identidad de 35.52% al gen del mismo nombre en *S. enterica* serovar Typhimurium que está relacionado con la resistencia a fluoroquinolonas (Ragheb *et al.*, 2019) de tal manera que este gen, según el autor ayudaría en la mutagénesis cuando existe presión por el antibiótico provocando la evolución de la bacteria al aumentar las mutaciones en ella.

En el año 2009 (Quispe, 2009) se aisló una cepa de *B. bacilliformis* de un paciente que terminó su tratamiento con ciprofloxacina, a quien se le encontró susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina; después de este año comenzaron los reportes de fallas en el tratamiento, en el 2015 se encontraron cepas clínicas que presentaban resistencia fenotípica a ciprofloxacina, utilizando diferentes pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (Mendoza y Flores-León, 2015). *In vitro*, se comprobó que *B. bacilliformis* frente a ciprofloxacina requiere el menor número de pasajes para volverse resistente (Gomes *et al.*, 2016). En trabajos previos de nuestro grupo de investigación sobre mutaciones en *B. bacilliformis*, trabajando *in vitro* con cepas clínicas

(USM-LMMB05 y USM-LMMB06) también se encontró resistencia con pocos pasajes, además estas cepas presentaban sensibilidad disminuida a este medicamento (Datos no publicados, 2016). Todos estos resultados ya alertaban de la resistencia intrínseca y constitutiva antes de la introducción de las quinolonas en la práctica clínica, por lo que su inclusión en las normas técnicas y recomendaciones clínicas sobre el uso de este medicamento en el Perú deberían ser evaluadas considerando su rápida resistencia.

Rifampicina, es otra droga que forma parte del tratamiento para el control de la EC (Tabla 1), es muy utilizada en la fase crónica eruptiva de la enfermedad, habiéndose demostrado que logra en menor tiempo la disminución y desaparición de las verrugas (Sobraques *et al.*, 1999). La resistencia a este fármaco ha sido atribuida a mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en una región limitada del gen *rpoB* que codifica a la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (Agapito *et al.*, 2002). Las investigaciones desde el año 1998, nos muestran que las mutaciones en las regiones determinantes de la resistencia a rifampicina del gen *rpoB* de cada una de las mutantes de *Staphylococcus aureus* obtenidas *in vitro* o después de terapia, tuvieron un cambio de un único par de bases dando como resultado una sustitución de aminoácidos en la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa. Se encontraron ocho cambios mutacionales en siete posiciones en el grupo de la región central para rifampicina; ciertas sustituciones, H481Y y D471Y (coordenadas de *S. aureus*), estuvieron presentes en varios mutantes. Las sustituciones Q468R, H481Y y R484H, que conferían resistencia de alto nivel a este fármaco, eran idénticas o estaban en el mismo codón que las descritas en otros géneros bacterianos (Aubry-Damon *et al.*, 1998). En *M. tuberculosis* se halló varias mutaciones en una región corta de 81 pb del gen *rpoB* (Rasolofo- Razanamparany *et al.*, 2001), entre ellas, las mutaciones puntuales en los codones S531, H526, G513 y D516, que han sido reportadas por tener altos niveles de resistencia en esta bacteria y también en *E. coli* (Agapito *et al.*, 2002). En *B. bacilliformis*, se encontró que presenta resistencia a rifampicina debido a mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la polimerasa del RNA polimerasa dirigida por DNA (Tabla 2). Los estudios *in vitro* en *B. bacilliformis* reportan sustituciones de aminoácidos

en las posiciones S531P; en nuestro análisis *in silico*, la subunidad beta de la polimerasa del RNA polimerasa dirigida por DNA tiene 49,74% de identidad con la proteína codificada por el gen *rpoB* de *Staphylococcus aureus* (Aubry-Damon *et al.*, 1998) (Tabla 5). Se han reportado estudios *in vitro* en *B. bacilliformis*, que señalan haber observado que las cepas 57.18, 57.19 y 57.20 de esta especie presentaron resistencia a rifampicina, siendo la cepa 57.19 la que presentó resistencia luego de 4 pasajes, con un halo inhibición de 0 mm. Esta cepa resistente tenía cambios aminoacídicos en las posiciones Q527R, H540Y, S545F y S588Y (Gomes *et al.*, 2016). Estas mutaciones estaban dentro de la zona RRDR (Región Determinante de Resistencia a Rifampicina) en *B. bacilliformis*, confiriéndole resistencia a esta droga. La resistencia a rifampicina, también se debe a la expresión de un sistema de eflujo (Biswas *et al.*, 2008) que se encuentra en las bacterias Gram negativas como la superfamilia RND, quien presenta MexW que es proteína de membrana tipo RND del complejo de eflujo de salida MexVW-OprM y que se encontró en *P. aeruginosa* PAO1 (Van *et al.*; 2000), además esta proteína presenta 36.38% de identidad con el transportador RND - HAE1 de *B. bacilliformis* cuya presencia se ha predicho en este estudio (Tabla 6). Por las investigaciones anteriores y por la predicción de una bomba de eflujo que puede expulsar rifampicina en la cepa *B. bacilliformis* KC583, podría estar relacionada con la rápida adquisición de resistencia de este fármaco.

En la actualidad *B. bacilliformis* está presentando poca sensibilidad a los antibióticos de elección, como cloranfenicol (Mendoza-Mujica y Flores-León 2015) y rifampicina (Gomes *et al.*, 2016) empleados en el tratamiento de la EC (Minsa, 2007). En este estudio se empleó programas bioinformáticos que ayudaron a tener una visión más amplia de los genes asociados al resistoma, relacionando e interconectando con los genomas de otras bacterias para poder comparar, analizar y ver la identidad entre las secuencias genómicas asociadas a la resistencia de *B. bacilliformis* y las de otras bacterias.

Algunos de los genes identificados están asociados a la resistencia de antibióticos que no se utilizan para el tratamiento de la EC, pero es de gran

importancia citarlos y tenerlos en cuenta para futuras investigaciones con antibióticos.

Este es el primer estudio sobre el resistoma antibiótico de *B. bacilliformis*, basado en el análisis de 17 genomas disponibles de esta especie bacteriana. se ha encontrado genes de *B. bacilliformis* que podrían estar relacionados a las fallas terapéuticas en la EC, puesto que presentaron identidad con genes de otras especies asociados a la resistencia a medicamentos como azitromicina, ciprofloxacino, rifampicina, trimetoprima, estreptomina, entre otros. Cabe resaltar que la EC es muy antigua y que el esquema de tratamiento se ha ido desarrollando sin conocimientos sobre la genética de la bacteria, por lo que ahora, los estudios genómicos como éste, realizados en *B. bacilliformis*, contribuirán con la generación de conocimientos sobre los mecanismos de resistencia y sobre el valor predictivo que podrían tener los estudios del resistoma, además de aportar a la toma de decisiones sobre el tratamiento de la EC, con la finalidad de prevenir y/o mitigar la resistencia antimicrobiana en este patógeno.

En el análisis para la búsqueda y predicción de proteínas drogables para *B. bacilliformis* USM-LMMB07 se obtuvieron seis proteínas, como resultado del desarrollo, evaluación e interacción de las rutas metabólicas utilizando plataformas bioinformáticas y algoritmos matemáticos que ayudaron a la selección de las proteínas que se vio enriquecida con otros filtros que involucra la identidad con proteínas humanas y con la microbiota intestinal, la suma de todos los filtros nos ha permitido predecir la localización de las proteínas, función molecular dentro de la bacteria e inferir los procesos biológicos que esta desarrolla.

En nuestro análisis dentro de la selección específica de proteínas drogables de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 (Tabla 10), se tiene a Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductasa FabI, una proteína altamente drogable que involucra seis vías metabólicas con una centralidad de 0.1, está presente en la membrana citoplasmática ejerciendo actividad catalítica y desarrollando procesos de



biosíntesis de ácidos grasos en la bacteria. Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductasa FabI es la última enzima en el ciclo de elongación de los ácidos grasos (Massengo-Tiassé y Cronan, 2009) y por su función biológica ha sido estudiada en varias especies como *Escherichia coli* (Bergler *et al.*, 1996); en donde cada ciclo de la biosíntesis de ácidos grasos es catalizada por la enoyl-ACP reductase; los autores reportaron que las actividades de NADH-dependiente y de NADPH-dependiente de enoyl-ACP residen en el gen *fabI*, mutaciones simultáneas en este gen afectan ambas actividades (Bergler *et al.*, 1996), así como en *Mycobacterium tuberculosis* (He *et al.*, 2006) *Pseudomonas aeruginosa* (Hoang y Schweizer, 1999) entre otras bacterias, siendo esta una función importante dentro del ciclo de la bacteria nos hace predecir cómo proteína blanco drogable, además en nuestros análisis de localización se encontró que la posición de la proteína dentro de la bacteria la hace más accesible a la droga. También fue seleccionada como blanco molecular en *Klebsiella pneumoniae* Kp13 (Ramos *et al.*, 2018).

La Dihidrofolato reductasa, una proteína que está presente en el citoplasma, y membrana extracelular, interviene en los procesos biológicos relacionados al metabolismo de drogas, en el proceso biosintético de amida y proceso biosintético de tetrahidrofolato, este último proceso deriva de la reducción del ácido dihidrofólico a tetrahidrofolato, metabolizando el folato. Inhibir el metabolismo del folato es un importante mecanismo en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Matos, 2016); en el metabolismo, la síntesis de folato es esencial para la biosíntesis de DNA y proteínas, además dihidrofolato reductasa es una de las proteínas esenciales de esta bacteria (Tabla 10). Investigaciones in silico sobre modelamiento para nuevos fármacos a partir de esta enzima demuestran buenos resultados obtenidos por diferentes enfoques computacionales que pueden ser útiles en el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos más potentes y con menos efectos colaterales (Matos, 2016)

Existe un interés en el descubrimiento y desarrollo de inhibidores DHFR de nueva generación como agentes antibacterianos teniendo a esta enzima como un objetivo seleccionable (Hawser *et al.*, 2006); DHFR es la enzima mejor

estudiada en la vía del folato pues presenta cerca de 239 estructuras cristalizadas para bacterias entre ellas *Escherichia coli* con 104, para *Staphylococcus aureus*, 56 y en *Mycobacterium tuberculosis* tiene 24 proteínas cristalizadas entre otros (Berman *et al.*, 2000). Nuestro análisis e investigaciones anteriores en otras bacterias demuestran lo importante que sería esta proteína como blanco molecular drogable en *B. bacilliformis* USM-LMMB07 para el tratamiento de la EC.

3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase es otra de las proteínas encontradas en nuestro análisis; está localizada en el citoplasma de la *B. bacilliformis* USM-LMMB07, tiene actividad transferasa, interviene en procesos biológicos tales como proceso biosintético de la familia de aminoácidos aromáticos y proceso biosintético de Chorismate. Esta enzima cataliza el sexto paso en la biosíntesis del corismato de los aminoácidos aromáticos (la vía del shikimate) en bacterias (gen *aroA*), plantas y hongos; en bacterias, comúnmente se considera un objetivo alvo para el desarrollo de fármacos antimicrobianos (Schomburg y Stephan, 1997).

Los estudios demuestran que *E. coli* presenta esta ruta metabólica (Bergler *et al.*, 1996) y realiza la síntesis de corismato. *E. coli* sintetiza los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano a partir de una prolongada y amplia ruta metabólica conjunta. La inhibición de la enzima clave 5-enolpiruvishikimate-3fosfato-sintasa (EPSP sintasa) bloquea la ruta de la síntesis común de esta vía (Müller-Esterl 2008).

En nuestro análisis de búsqueda de proteínas drogables, se observó que esta enzima es esencial para *B. bacilliformis* USM-LMMB07 (Tabla 10), inhibir esta enzima bloquearía la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en la bacteria, por lo que sería una buena opción tenerla como proteína blanco objetivo para el desarrollo de nuevas drogas antimicrobianas en la elección de nuevas terapias farmacéuticas.

En este estudio se reveló que la proteína FADH(2)-oxidizing

methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C(5))- methyltransferase TrmFO, con un tamaño de 464 aminoácidos se localiza en el citoplasma, y está involucrada en el procesamiento de tRNA desarrolla funciones moleculares como actividad Methyltransferase y participa en la unión del dinucleótido flavina adenina (Tabla 10), es una proteína altamente drogable con un índice de 0.746 de drogabilidad (Tabla 8); además TrmFO es encontrada ampliamente entre Gram-positivos y algunas Bacterias Gram-negativas que incluyen *T. thermophilus* (Urbonavičius *et al.*, 2005), esta misma proteína se observó en *B. subtilis*, donde TrmFO forma un enlace covalente complejo con ARNt (Hamdane *et al.*, 2011) a través de Cys226. Los autores deducen que la estabilidad del complejo covalente parece ser bastante diferente entre las enzimas TrmFO de *B. subtilis* y *T. thermophilus*. La sorprendente similitud de secuencias de aminoácidos de ambas enzimas sugiere que estas enzimas TrmFO tienen el mismo mecanismo catalítico (Urbonavičius *et al.*, 2005). Otros estudios sobre la misma proteína en *Mycoplasma bovis* (Guo *et al.*, 2017), demuestra su papel en la citoadherencia en esta especie. Las investigaciones anteriores basadas en esta proteína, nos hace predecir como blanco drogable tanto para otras especies, como para *B. bacilliformis* USM-LMMB07.

Undecaprenyl-diphosphatase es una proteína que se encuentra localizada en la membrana citoplasmática (Chung *et al.*, 2013) presenta función catalítica, y es un componente integral de la membrana de *B. bacilliformis* USM-LMMB07 (Tabla 10). Esta enzima se ha estudiado *in silico* como blanco molecular drogable en *Streptococcus suis* (Shinde *et al.*, 2013) y *Clostridium botulinum* (Bhardwaj y Somvanshi, 2017). La enzima está codificada por el gen *uppP* (sinónimos *bacA* y *upk*) (Otten *et al.*, 2018) y participa en la biosíntesis del péptidoglucano, catalizando la desfosforilación del undecaprenil difosfato para convertirlo en undecaprenil fosfato (El Ghachi *et al.* 2004, 2018); éste último es una molécula de naturaleza lipídica que transporta al precursor del peptidoglucano desde el citoplasma al periplasma atravesando la membrana citoplasmática (El Ghachi *et al.*, 2018, Workman *et al.*, 2018). La sobreexpresión de undecaprenyl-diphosphatase genera resistencia a bacitracina (El Ghachi *et al.*, 2004). Nosotros hemos encontrado que esta proteína es altamente drogable

para *B. bacilliformis* USM-LMMB07, por lo que, considerarla como diana potencial de una droga dirigida, ayudaría a desestabilizar su pared celular.

La proteína UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase, fue encontrada en nuestros análisis y está localizada en el citoplasma, realiza funciones de unión al ion magnesio, unión al ATP, tiene actividad ligasa, y en los procesos biológicos de la bacteria participa en el ciclo celular, proceso biosintético de peptidoglicano, división celular y en la organización de la pared celular (Tabla 09). Esta proteína ha sido estudiada en *Pseudomonas aeruginosa* (Paradis-Bleau *et al.*, 2009) y como potencial objetivo farmacológico en *Leptospira interrogans* (Amineni *et al.*, 2010) en donde está involucrada en dos vías que serían los únicos objetivos de medicamentos contra *Leptospira* identificados. Otra especie bacteriana donde la misma proteína es considerada como drogable es en *Enterobacter cloacae* (Yadav *et al.*, 2016).

El análisis de esta proteína reveló que forma parte del proceso biológico biosintético del peptidoglicano en *B. bacilliformis* USM-LMMB07. Según Otten (Otten *et al.*, 2018) el gen *murE* está presente en todos los organismos que poseen peptidoglicano completo o intermedio (Otten *et al.*, 2018). Los procesos biológicos que esta proteína realiza y la alta drogabilidad que presenta la hace un blanco objetivo perfecto para desarrollo de nuevos fármacos dirigidos para inhibir su proceso y funciones que ejecuta dentro de la bacteria, inhibir sería alternativa ideal para interrumpir desarrollo y crecimiento del patógeno.

## 8. CONCLUSIONES

Los genomas analizados 0de *Bartonella bacilliformis* tienen alta similaridad entre ellos.

El resistoma de *B. bacilliformis* KC583 presenta genes que codifican proteínas involucradas en la resistencia a los antibióticos, incluyendo a los genes utilizados para su tratamiento, con similaridad a las proteínas de otras especies bacterianas resistentes; encontramos genes asociados con la resistencia a los antibióticos, como los reportados previamente (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) y genes nunca antes estudiados como *gidB*; *rpoC*; *folA*; *ddl*; *almurA*; *fusA*; *fabF*; *pgsA*; *ileS*; *rho* y *rpsJ*; éstas se reportan en otras especies bacterianas resistentes a antibióticos.

*Bartonella bacilliformis* USM-LMMB07 presenta 6 proteínas altamente drogables codificadas en su genoma, según la predicción con Target Pathogen, las cuales son enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabI, dihydrofolate reductase, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, FADH(2)-oxidizing methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C(5))- methyltransferase TrmFO, undecaprenyl-diphosphatase, y UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2, 6-diaminopimelate ligase .

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aakra, A., Vebo, H., Indahl, U., Snipen, L., Gjerstad, O., Lunde, M., Nes, I.F. 2010. "The Response of *Enterococcus faecalis* V583 to Chloramphenicol Treatment." *Int J Microbiol* : 483048.
2. Agapito, J., V. Neyra, J. Castro, R. Accinelli, I. Rodríguez, J. R. Espinoza. 2002. "Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoβ* asociadas a la rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 19(3): 117-123.
3. Akerley, B. J., Rubin, E. J., Novick, V. L., Amaya, K., Judson, N., Mekalanos, J. J. 2002. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 966-971.
4. Alam, M. M., Islam, M., Wahab, A., & Billah, M. 2019. Antimicrobial resistance crisis and combating approaches. *Journal of Medicine*, 20(1), 38-45.
5. Alcock, B. P., Raphenya, A.R., Lau, T.T. , Tsang, K.K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.V., Cheng, A.A., Liu, S., Min, S.Y., Miroshnichenko, A., Tran, H., Werfalli, R.E., Nasir, J.A., Oloni, M., Speicher, D.J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., Hernandez-Koutoucheva, A., Sharma, A.N., Bordeleau, E., Pawlowski, A.C., Zubyk, H.L., Dooley, D., Griffiths, E., Maguire, F., Winsor, G. L., Robert G Beiko, Fiona S L Brinkman, Hsiao, W.L., Domselaar, G., Andrew G McArthur. A.G. 2020. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database, *Nucleic Acids Research*, Volume 48, Issue D1, 08 January 2020, Pages D517–D52. Disponible en <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
6. Altschul, S. F., Madden, T.L., Schaffer, A.A, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-3402.
7. Amineni, U., Pradhan, D., Marisetty, H. 2010. In silico identification of common putative drug targets in *Leptospira interrogans*. *Journal of*

- chemical biology* 3, 165-173.
8. Angelakis, E., Biswas, S., Taylor, C., Raoult, D., Rolain, J.M. 2008. "Heterogeneity of susceptibility to fluoroquinolones in *Bartonella* isolates from Australia reveals a natural mutation in *gyrA*." *Journal of antimicrobial chemotherapy* 61(6): 1252-1255.
  9. Arroyo, Á. 2008. Esquemas de tratamiento para la enfermedad de Carrión no complicada en la ciudad de Caraz, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina, UNMSM. Facultad de Medicina.*
  10. Aubry-Damon, H., Soussy, C.J., Courvalin, P. 1998. "Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42(10): 2590-2594.
  11. Battisti, J. M., Smitherman, L.S., Samuels, D.S., Minnick, M.F. .1998. "Mutations in *Bartonella bacilliformis gyrB* confer resistance to coumermycin A1." *Antimicrob Agents Chemother* 42(11): 2906-2913.
  12. Bhardwaj, T., Somvanshi, P. 2017. Pan-genome analysis of *Clostridium botulinum* reveals unique targets for drug development. *Gene* 623, 48-62.
  13. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. 2000. "The protein data bank." *Nucleic acids research* 28(1): 235-242.
  14. Bergler, H., Fuchsbichler, S., Högenauer, G., Turnowsky, F. 1996. The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (FabI) of *Escherichia coli*, which catalyzes a key regulatory step in fatty acid biosynthesis, accepts NADH and NADPH as cofactors and is inhibited by palmitoyl-CoA. *European journal of biochemistry* 242, 689-694.
  15. Biswas, S., Raoult, D., Rolain, J.M. 2007. "Molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Bartonella bacilliformis*." *J Antimicrob Chemother* 59(6): 1065-1070.
  16. Biswas, S., D. Raoult and J.-M. Rolain. 2008. "A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis." *International journal of antimicrobial agents* 32(3): 207- 220.

17. Biswas, S., Raoult, D., Rolain, J.M. 2009. "Molecular characterisation of resistance to rifampin in *Bartonella quintana*." *Clinical Microbiology and Infection* 15: 100-101.
18. Biswas, S., Rolain, J.M. 2010. "*Bartonella* infection: treatment and drug resistance." *Future microbiology* 5(11): 1719-1731.
19. Bogomolnaya, L. M., Andrews, K.D., Talamantes, M., Maple, A., Ragoza, Y., Vázquez-Torres, Andrews-Polymeris. H. 2013. "The ABC-type efflux pump MacAB protects *Salmonella enterica* serovar typhimurium from oxidative stress." *MBio* 4(6): e00630-00613.
20. Carrión, D. A. (1998). Apuntes sobre la verruga peruana. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 59, No. 3, pp. 207-212). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
21. Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P. 2008. "Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France." *Antimicrob Agents Chemother* 52(10): 3801-3804.
22. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades: Resumen de las enfermedades o eventos bajo vigilancia epidemiológica en el Perú. 2016. *Bol Epidemiol.* 25 (52): 1189 – 1193.
23. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. 2018. Resumen de las enfermedades o eventos bajo vigilancia epidemiológica en el Perú. *Boletín Epidemiológico del Perú.* *Bol Epidemiol* 27 (49): 1158-1163.
24. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. 2019. Resumen de las enfermedades o eventos bajo vigilancia epidemiológica en el Perú. *Boletín Epidemiológico del Perú.* *Bol Epidemiol.* 28 (49): 1257 – 1262.
25. Champney, W. S. 2001. "Bacterial ribosomal subunit synthesis: a novel antibiotic target." *Curr Drug Targets Infect Disord* 1(1): 19-36.
26. Cheng, A. C., Coleman, R.G., Smyth, K.T., Cao, Soulard, P., Caffrey, D.R., Salzberg C., Huang, E.S. 2007. "Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability." *Nature biotechnology* 25(1): 71.



27. Chittum, H. S., Champney, W.S. 1995. "Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells." *Curr Microbiol* 30(5): 273-279.
28. Chung B.C., Zhao J., Gillespie R.A., Kwon D.Y., Guan Z., Hong J., Zhou P., Lee S.Y. 2013. Crystal structure of MraY, an essential membrane enzyme for bacterial cell wall synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6149), 1012–1016. <https://doi.org/10.1126/science.1236501>
29. Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J., Kalogeraki, V., Passarelli, B., Collier, A., Fero, M., McAdams, H., Shapiro, L. 2011. The essential genome of a bacterium. *Molecular systems biology* 7.
30. Consortium, T. 2018. "UniProt: the universal protein knowledgebase." *Nucleic Acids Res* 46(5): 2699.
31. del Valle, L., Flores, L., Vargas, M., García-de-la-Guarda, R., Quispe, R.L., Ibañez, Z.B., Alvarado, D., Ramírez, P., Ruiz, J. 2010. "*Bartonella bacilliformis*, endemic pathogen of the Andean region, is intrinsically resistant to quinolones." *International Journal of Infectious Diseases* 14(6): e506-e510.
32. Del Valle-Mendoza, J., Rojas-Jaimes, J., Vasquez-Achaya, F., Aguilar-Luis, M.A., Correa-Nunez, G., Silva-Caso, W., Lescano, A.G., Song, X., Liu, Q., Li, D. 2018. "Molecular identification of *Bartonella bacilliformis* in ticks collected from two species of wild mammals in Madre de Dios: Peru." *BMC Res Notes* 11(1): 405.
33. Diner, E. J., Hayes, C. S. 2009. "Recombineering reveals a diverse collection of ribosomal proteins L4 and L22 that confer resistance to macrolide antibiotics." *Journal of molecular biology* 386(2): 300-315.
34. Dörbecker, C., Sander, A., Oberle, K., Schülin-Casonato, T. 2006. "In vitro susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(4): 784-788.
35. Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Van Veen, H. W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., Luisi, B.F. 2018. "Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation." *Nat Rev Microbiol*.
36. Elbourne, L. D., Tetu, S.G., Hassan K.A., Paulsen. I.T. 2017.

- "TransportDB 2.0: a database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life." *Nucleic Acids Res* 45(D1): D320-D324.
37. El Ghachi, M., Howe, N., Huang, Ch. Olieric, V., Warshamanage, R., Touzé, T., Weichert, D., Phillip J. Stansfeld, P., Wang, M., Kerff, F., Caffrey, M. 2018. Crystal structure of undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase and its role in peptidoglycan biosynthesis. *Nature communications* 9, 1078.
  38. El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D., Mengin-Lecreux, D. 2004. The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *Journal of Biological Chemistry* 279, 30106-30113.
  39. Espinoza-Culupú, A., Quispe-Gaspar, R., Jaramillo, M., Icho, M., Eca, E., Ramírez, P., Alvarado, D., Guerrero, J. C., Vargas-Vásquez, F., Córdova, O. 2014. "Caracterización molecular de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de la topoisomerasa IV de *Bartonella bacilliformis* en aislados clínicos." *Revista peruana de biología* 21(1): 089-098.
  40. Espinoza -Culupú, A. 2014. Caracterización de las regiones determinantes de resistencia a antimicrobianos de cepas de *Bartonella bacilliformis* aisladas de zonas endémicas del Perú. Magister thesis, Universidad Nacional Mayor San Marcos.
  41. Fair, R. J., Tor, Y. 2014. "Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century." *Perspect Medicin Chem* 6: 25-64.
  42. Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A.. 2016. "The Pfam protein families database: towards a more sustainable future." *Nucleic Acids Res* 44(D1): D279-285.
  43. Finn, R. D., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Bateman, A., Bork, A. P., Bridge, A.J., Chang, H.Y., Dosztanyi, Z., S. El-Gebali, S., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Holliday, G.L., Huang, H., Huang, X., Letunic, I., López, R., Lu S., Marchler-Bauer, A., H. Mi, Mistry, H. J., Natale, D.A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C.A., Park, Y., Pesseat, S., Piovesan, D.,

- Potter, S.C., Rawlings, N.D., Redaschi, N., Richardson, L., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C., Sillitoe, I., Smithers, B., Squizzato, S., Sutton, G., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C., Wu, C.H., Xenarios, I., Yeh, L.S., Young, S.Y., Mitchell, A.L. 2017. "InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations." *Nucleic Acids Res* 45(D1): D190-D199.
44. Flores, L. 2008. Estudios moleculares en *Bartonella bacilliformis* para el control de la enfermedad de Carrion. Máster Thesis, Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
45. Franceschi, F., Z. Kanyo, E. C. Sherer, J. Sutcliffe. 2004. "Macrolide resistance from the ribosome perspective." *Curr Drug Targets Infect Disord* 4(3): 177-191.
46. Fitzpatrick A.W.P, Llabrés S., Neuberger A., Blaza J.N., Bai X.C., Okada U., Murakami S., Veen H.W., Zachariae U., Scheres S.H.W., Luisi B.F., Du D. 2017. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat Microbiol.* 2:17070. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.70. PMID: 28504659; PMCID: PMC5447821.
47. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. 2005. Protein identification, analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*, Springer: 571-607.
48. Gomes, C., S. Martinez-Puchol, L. Ruiz-Roldan, M. J. Pons, J. Del Valle Mendoza, J. Ruiz. 2016. "Development and characterisation of highly antibiotic resistant *Bartonella bacilliformis* mutants." *Sci Rep* 6: 33584.
49. Gomes, C., Ruiz, J. 2018. "Carrion's disease: the sound of silence." *Clinical microbiology reviews* 31(1): e00056-00017.
50. González, I. P. 2005. "Detección de mutaciones en el gen *rpoB* relacionadas con resistencia a Rifampicina en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del estado de Puebla."
51. Grape, M., Sundstrom, L., Kronvall, G. 2007. "Two new *dfp* genes in trimethoprim-resistant integron-negative *Escherichia coli* isolates." *Antimicrob Agents Chemother* 51(5): 1863-1864.
52. Guo, Y., Zhu, H., Wang, J., Huang, J., Khan, F., Zhang, J., Guo, A., Chen, X. 2017. "TrmFO, a fibronectin-binding adhesin of *Mycoplasma*

- bovis." International journal of molecular sciences 18(8): 1732.
53. Guzmán, J. 2014. Situación epidemiológica de la enfermedad de Carrión en el Perú, SE 35- 2014. Lima-Perú, Minsa. 23(35): 24.
54. Hamdane, D., Guerineau, V., Un, S., Golinelli-Pimpaneau, B. 2011. "A catalytic intermediate and several flavin redox states stabilized by folate-dependent tRNA methyltransferase from *Bacillus subtilis*." Biochemistry 50(23): 5208-5219.
55. Hawser, S., Lociuero, S., Islam, K. 2006. "Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents." Biochemical pharmacology 71(7): 941-948.
56. He, X., Alian, A., Stroud, R., Ortiz de Montellano, P. 2006. "Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*." Journal of medicinal chemistry 49(21): 6308-6323.
57. Heath RJ, Yu YT, Shapiro MA, Olson E, Rock CO. Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. J Biol Chem. 1998; 273(46): 30316-20.
58. Henríquez, C., Infante, B., Merello, J., Santivañez, L., Maguiña Vargas, C., Guerra Allison, H., Birtles, R., Ventosilla, P. 2002. "Identificación de *Bartonella bacilliformis* por métodos moleculares." Revista Médica Herediana 13(2): 58-63.
59. Hoang, T. T., Schweizer, H. 1999. "Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis." Journal of bacteriology 181(17): 5489-5497.
60. Hopkins, A. L., Groom, C.R. 2002. "The druggable genome." Nature reviews Drug discovery 1(9): 727.
61. Huarcaya, E., Best, I., Rodríguez-Tafur, J., Maguiña, C., Solórzano, N., Menacho, J., Lopez De Guimaraes D., Chauca, J., Ventosilla, P. 2011. Citoquinas y recuento de Linfocitos T en pacientes en fase aguda y crónica de infección por *Bartonella bacilliformis*, en un área endémica del Perú: estudio piloto. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 53(3), 149-154.

62. Ji, Y. Yinduo Ji, Zhang, B., Van, S., Horn, Warren, P., Woodnutt, G., Burnham, M., Rosenberg, M. 2001. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* 293, 2266-2269.
63. Jin, D. J., C. A. Gross. 1988. "Mapping and sequencing of mutations in the Escherichia coli rpoB gene that lead to rifampicin resistance." *J Mol Biol* 202(1): 45-58.
64. Karp P.D., Latendresse M., Caspi R. 2011. The pathway tools pathway prediction algorithm. *Stand Genomic Sci*, 5: 424-29.
65. Kobayashi, N., Nishino, K., Yamaguchi, A. 2001. "Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in Escherichia coli." *J Bacteriol* 183(19): 5639-5644.
66. Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L.C., Danchin, A., Débarbouillé, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S.K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S.J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C.R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M.F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauël, C., Meima, R, Mellado, R.P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H.M., Rapoport, G., Rawlins, J.P. , Rivas, L.A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H.H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J.F.M.L., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Séror, S.J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H.B., Vagner, V., van Dijl, J.M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., N. Ogasawara, N. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4678-4683.

67. Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T. 2003. "A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* 52(4): 572-575.
68. Maguiña, C., García, P. J., Gotuzzo, E., Cordero, L., Spach, D.H. 2001. "Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era." *Clinical infectious diseases* 33(6): 772-779.
69. Marchetti, M. L., Errecalde, J. O., & Mestorino, O. N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. *Analecta Veterinaria*, 31. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11280>
70. Massengo-Tiassé, R. P., Cronan, J.E. 2009. "Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases." *Cellular and molecular life sciences* 66(9): 1507- 1517.
71. Matos, I. D. A. 2016. "Planejamento in silico de inibidores da enzima dihidrofolato redutase." Tesis de maestría. Universidad Federal de Sergipe- Programa de Pos graduación en química.
72. Mendoza-Mujica, G., D. Flores-Leon. 2015. "Antimicrobial resistance of *Bartonella bacilliformis* strains from regions endemic to bartonellosis in Peru." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 32(4): 659-666.
73. Mendoza Mujica, G., Espinoza-Culupu A O., Flores Leon D. 2015. "Unreported Antimicrobial Resistance Genes Mutations in Peruvian *Bartonella bacilliformis* Strains." 115th General Meeting of American Society for Microbiology.
74. Minnick, M. F., Wilson, Z.R., Smitherman, L.S., Samuels. D.S. 2003. "*gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained in vitro." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(1): 383-386.
75. MINSA. 2007. "Atención de la bartonellosis o enfermedad de carrion en el Perú " Norma Técnica N° 048-MINSA/DGSP-V.01: 74.
76. Müller-Esterl, W. 2008. *Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*, Reverté.
77. NIH HMP Working Group. 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19, 2317–2323.

78. Nishimoto, Y., Kobayashi, N., Alam, M.M., Ishino, M., Uehara, N., Watanabe, N. 2005. "Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital." *Microb Drug Resist* 11(2): 146-153.
79. Otten, C., Brill, M., Vollmer, W., Viollier, P. H., Salje, J. 2018. Peptidoglycan in obligate intracellular bacteria. *Molecular microbiology* 107, 142-163.
80. Pachas Chávez, P. E. 2001. Enfermedad de Carrión (Bartolosis) en el Perú. In *Enfermedad de Carrión (Bartolosis) en el Perú*. p(88-88).
81. Paradis-Bleau, C., Lloyd, A., Sanschagrin, F., Maaroufi, H., Clarke, T., Blewett, A., Dowson, C., Roper, D.I., Bugg, T., Levesque, R. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* MurE amide ligase: enzyme kinetics and peptide inhibitor. *Biochem journal* 421, 263–272. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20081395>.
82. Paulsen, I. T., Sliwinski M.K., Saier Jr, M.H. 1998. "Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities1." *Journal of molecular biology* 277(3): 573-592.
83. Pechter, K. B., Gallagher, L., Pyles, H., Manoil, C. S., Harwood, C. S. 2016. Essential genome of the metabolically versatile alphaproteobacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Journal of bacteriology* 198, 867-876.
84. Peric, M., Bozdogan, B., Jacob, M. R, Appelbaum, P. C. .2003. "Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates." *Antimicrob Agents Chemother* 47(3): 1017-1022.
85. Piddock, L.J. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 19: p. 382-402.
86. Qiu, J., Zhou, D., Qin, L., Han, Y., Wang, X., Du, M Z., Song, Y., Yang, R. 2006. "Microarray expression profiling of *Yersinia pestis* in response to chloramphenicol." *FEMS microbiology letters* 263(1): 26-31.
87. Quispe, R. 2009. Caracterización molecular de los genes asociados a

- la resistencia antimicrobiana en *Bartonella bacilliformis*, Tesis bachiller. Lima: Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.
88. Ragheb, M., Thomason, M., Hsu, K., Nugent, C., Gage, P., Samadpour, J., Kariisa, A., Merrikkh, A., Miller, C., Sherman, S., Merrikkh, D. 2019. Inhibiting the evolution of antibiotic resistance. *Molecular cell*, 73(1), 157-165.
  89. Rahman, T., Yarnall, B., Doyle, D.A. 2017. "Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance." *Eur Biophys J* 46(7): 647-653.
  90. Ramos, P. I. P., Do Porto, D. F., Lanzarotti, E., Sosa, E. J., Burguener, G., Pardo, A. Cecilia C. Klein, C.C., Marie-France Sagot, de Vasconcelos, A.T., Gales, A.C., Marti, M., Turjanski, A.G., Nicolás, M.F. 2018. An integrative, multi-omics approach towards the prioritization of *Klebsiella pneumoniae* drug targets. *Scientific reports*, 8(1), 1-19.
  91. Rasolofo-Razanamparany, V., Ramarokoto, H., Aurégan, G., Gicquel B., Chanteau. S. 2001. "A combination of two genetic markers is sufficient for restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in areas with a high incidence of tuberculosis." *Journal of clinical microbiology* 39(4): 1530-1535.
  92. Roggo, C., Coronado, E., Moreno-Forero, S. K., Harshman, K., Weber, J., van der Meer, J. R. 2013. Genome-wide transposon insertion scanning of environmental survival functions in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW 1. *Environmental microbiology* 15, 2681-2695.
  93. Rolain, J., Brouqui, P., Koehler, J., Maguina, C., Dolan, M., Raoult, D. 2004. "Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6): 1921-1933.
  94. Rouquette-Loughlin, C. E., Balthazar, J.T., Shafer, W.N. 2005. "Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*." *J Antimicrob Chemother* 56(5): 856-860.
  95. Ruiz, J. 2003. "Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection." *J*



- Antimicrob Chemother 51(5): 1109-1117.
96. Salama, N. R., Shepherd, B., Falkow, S. 2004. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* 186, 7926-7935.
  97. Serral, 2021 Exploración y priorización de blancos moleculares para el diseño de nuevos fármacos contra *Staphylococcus aureus* mediante técnicas bioinformáticas.
  98. Shaw, W.V. 1983. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit Rev. Biochem*, 14:1–46.
  99. Shinde, P., Patil, K., Malavkar, N., Dalvi, A., Janve, M. 2013. "In Silico Subtractive Proteomics Approach for Identification and Characterization of Drug Targets in *Streptococcus suis*." *Research & Reviews: Journal of Computational Biology* 2.2 : 1-5.
  100. Schomburg, D., Stephan, D. 1997. 3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase. *Enzyme Handbook* 13, Springer: 85-90.
  101. Serafini, F., Bottacini, F., Viappiani, A., Baruffini, E., Turrone, F., Foroni, E., Lodi, T., van Sinderen, D., Ventura, M. 2011. "Insights into physiological and genetic mupirocin susceptibility in bifidobacteria." *Applied and environmental microbiology* 77(9): 3141-3146.
  102. Soares, S. C., Geyik, H., Ramos, R.T., de Sá, P.H, Barbosa, E.G., Baumbach, J., Figueiredo, H.C., Miyoshi, A., Tauch, A., Silva, A. 2016. "GIPSY: Genomic island prediction software." *Journal of biotechnology* 232: 2-11.
  103. Sobraqués, M., Maurin, M., Birtles, R.J., Raoult, D. 1999. "In vitro susceptibilities of four *Bartonella bacilliformis* strains to 30 antibiotic compounds." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43(8): 2090-2092.
  104. Sosa, E. J., Burguener, G., Lanzarotti, E., Defelipe, L., Radusky, L., Pardo, A.M., Marti, M., Turjanski, A. G., Fernández Do Porto, D. 2018. "Target- Pathogen: a structural bioinformatic approach to prioritize drug targets in pathogens." *Nucleic acids research* 46(D1): D413-D418.
  105. Szmolka, A., Nagy, B. 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol*, 2013. 4: p. 258.

106. Tarazona, A., Maguiña, C., López de Guimaraes, D., Montoya, M., Pachas, P. 2006. "Terapia antibiótica para el manejo de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión en el Perú." *Revista peruana de medicina experimental y salud publica* 23(3): 188-200.
107. Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T., Lowrie, D., Colston, M., Cole, S. 1993. "Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*." *The Lancet* 341(8846): 647-651.
108. Torres, C. 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Discurso de recepción académica. :15–38.
109. Urbonavičius, J., Skouloubris, S., Myllykallio, H., Grosjean, H. 2005. "Identification of a novel gene encoding a flavin-dependent tRNA: m5U methyltransferase in bacteria—evolutionary implications." *Nucleic acids research* 33(13): 3955-3964.
110. Van Bambeke, F., Balzi, E., Tulkens, P. M. 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical pharmacology*, 60(4), 457-470.
111. Vanden B. A., McEwen A.G., Chebaro. Y., Potier N., Lamour V. 2019. Structural Basis for DNA Gyrase Interaction with Coumermycin A1. *J Med Chem.* 62(8):4225-4231. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01928
112. Wattam, A. R., Davis, J. J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L. 2016. "Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center." *Nucleic acids research* 45(D1): D535-D542.
113. Wright, G. D. 2010. "The antibiotic resistome." *Expert opinion on drug discovery* 5(8): 779-788.
114. Workman, S. D., Worrall, L. J., Strynadka, N. C. 2018. Crystal structure of an intramembranal phosphatase central to bacterial cell-wall peptidoglycan biosynthesis and lipid recycling. *Nature communications* 9, 1159.
115. Wu, J. R., Shieh, H.K., Shien, J.H., Gong, S.R., Chang, P.C.. 2003. "Molecular characterization of plasmids with antimicrobial resistant genes in avian isolates of *Pasteurella multocida*." *Avian Dis* 47(4): 1384-

1392.

116. Webb, B., y Sali, A. 2014. Protein structure modeling with MODELLER. In *Protein structure prediction* (pp. 1-15). Humana Press, New York, NY.
117. Xie, L., Bourne, P.E. 2007. "A robust and efficient algorithm for the shape description of protein structures and its application in predicting ligand binding sites." *BMC Bioinformatics* 8 Suppl 4: S9.
118. Xu, Y., Sim, S.H., Song, S., Piao, S., Kim, H.M., Jin, X.L., Lee, K., Ha, N.C. 2010. "The tip region of the MacA alpha-hairpin is important for the binding to TolC to the Escherichia coli MacAB-TolC pump." *Biochem Biophys Res Commun* 394(4): 962-965.
119. Yadav, P. K., Shukla, S., Malhotra, S. K. 2016. In Silico Putative Drug Target Identification in Enterobacter Cloacae and Homology Modelling of a Candidate Drug Target. Omega Online Publisher Journal of Bioinformatics and Proteomics Review. Volume 2: Issue 1.
120. Yeh I, Hanekamp T, Tsoka S, Karp PD, Altman RB. Computational analysis of *Plasmodium falciparum* metabolism: organizing genomic information to facilitate drug discovery. *Genome Res.* 2004; 14(5): 917-24.
121. Yoshida, H., Kojima, T., Yamagishi, J., Nakamura, S. 1988. "Quinolone-resistant mutations of the gyrA gene of Escherichia coli." *Molecular and General Genetics* MGG 211(1): 1-7.
122. Yu, N. Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster. L.J. 2010. "PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes." *Bioinformatics* 26(13): 1608-1615.
123. Yum, S., Xu, Y., Piao, S., Sim, S.H., Kim, H.M., Jo, W.S., Kim, K.J., Kweon, H.S., Jeong, M.H., Jeon, H., Lee, K., Ha, N.C. 2009. "Crystal structure of the periplasmic component of a tripartite macrolide-specific efflux pump." *J Mol Biol* 387(5): 1286-1297.