



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E
INGENIERÍA

Programa de Maestría en Ciencias

**“Caracterización bioquímica parcial y funcional
de la proteína MAP3773c de *Mycobacterium
avium subsp. paratuberculosis*”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. GERMÁN IBARRA MOLINA

Directora de Tesis:

Dra. Bertha Landeros Sánchez

Co-Directora de Tesis:

Dra. María Francisca Fillat Castejón

Tijuana, Baja California

Diciembre de 2016.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 195

Tijuana, B. C., a 2 de diciembre de 2016

C. Germán Ibarra Molina
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por las Dras. Bertha Landeros Sánchez y María Francisca Fillat Castejón
Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al
tema: "Caracterización bioquímica parcial y funcional de la proteína MAP3773c de
Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis"

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCION
- III.- JUSTIFICACION
- IV.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS
- V.- MATERIALES Y MÉTODOS
- VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

Dr. José Luis González Vázquez
Secretario

Dra. Bertha Landeros Sánchez
Directora de Tesis

Dra. María Francisca Fillat Castejón
Co-Directora de Tesis

Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

A mis padres

ÍNDICE DE CONTENIDO

	ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
	ÍNDICE DE TABLAS.....	7
	ABREVIATURAS.....	8
I.	RESUMEN.....	9
	ABSTRACT.....	10
II.	INTRODUCCIÓN.....	11
	I.1 Género <i>Mycobacterium</i>	11
	I.2 Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC).....	13
	I.3 <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> (MAP).....	14
	I.4 Paratuberculosis.....	15
	I.5 Enfermedad de Crohn.....	19
	I.6 Metabolismo del hierro en procariotas.....	20
	I.7 Familia de Proteínas Fur.....	23
III.	JUSTIFICACIÓN.....	26
IV.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
	III.1 Hipótesis.....	27
	III.2 Objetivo general.....	27
	III.3 Objetivos específicos.....	27
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
	IV.1 Obtención de sondas de ADN con caja de hierro mediante PCR.....	28
	IV. 2 Purificación y cuantificación del plásmido pRSET-MAP3773c.....	34
	IV. 3 Transformación de <i>Escherichia coli</i> y pruebas de sobreexpresión.....	35
	IV. 4 Purificación y cuantificación de la proteína recombinante MAP3773c.....	40
	IV. 5 Pruebas para la caracterización bioquímica y funcional de la proteína MAP3773c: Análisis espectrofotométrico, presencia de zinc, oligomerización y entrecruzamiento, western blot, dicroísmo circular, titulación de calorimetría isotérmica (ITC) y ensayo de movilidad retardada electroforética (EMSA).....	46
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
VII.	CONCLUSIONES.....	63
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la composición de la pared celular de las micobacterias.....	11
Figura 2. Imágenes de los bacilos de <i>Map</i> , observados al microscopio.....	13
Figura 3. Representación circular de las secuencias de inserción y secuencias repetidas en el genoma de <i>Map</i>	17
Figura 4. Posibles vías de transmisión de los miembros del complejo <i>M. avium</i>	24
Figura 5. Casos de paratuberculosis en México, 2004-2009.....	27
Figura 6. Colonias de <i>Map</i> de origen bovino, aisladas en medio HEYM.....	36
Figura 7. Colonias de <i>Map</i> , aisladas en diferentes tipos de medio.....	37
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa en donde se observan los distintos patrones de restricción dados por las cepas C y S de <i>Map</i>	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la composición de la pared celular de las micobacterias.....	11
Figura 2. Imágenes de los bacilos de <i>Map</i> , observados al microscopio.....	13
Figura 3. Representación circular de las secuencias de inserción y secuencias repetidas en el genoma de <i>Map</i>	17
Figura 4. Posibles vías de transmisión de los miembros del complejo <i>M. avium</i>	24
Figura 5. Casos de paratuberculosis en México, 2004-2009.....	27
Figura 6. Colonias de <i>Map</i> de origen bovino, aisladas en medio HEYM.....	36
Figura 7. Colonias de <i>Map</i> , aisladas en diferentes tipos de medio.....	37
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa en donde se observan los distintos patrones de restricción dados por las cepas C y S de <i>Map</i>	42

I.- INTRODUCCIÓN

I.1 Género *Mycobacterium*

La primera identificación de una micobacteria data de finales del siglo XIX, momento en el que se describió el bacilo tuberculoso (denominado *Bacterium tuberculosis* por Robert Koch en 1882) y el bacilo de la lepra (denominado *Bacillus leprae* por Armauer Hansen en 1880). Sin embargo, la clasificación de ambas especies como micobacterias no tuvo lugar hasta 1896, año en el cual Lehmann y Neumann propusieron que ambas bacterias se incluyeran dentro del género *Mycobacterium* y a las cuales ellos renombrarían *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Lehman y Neumann, 1896).

Taxonómicamente las micobacterias están incluidas en el reino *Bacteria*, phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium* (segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*). Esta división inicial estaba basada en dos características presentes en todos y cada uno de los miembros del género: la morfología (bacilos, inmóviles) y la ácido-alcohol resistencia (Lehmann y Neumann, 1896).

Los siguientes criterios adicionales para la diferenciación de los miembros del género *Mycobacterium* son la tasa de crecimiento, la resistencia a la penicilina, el porcentaje de guanidina y citosina, el perfil de ácidos micólicos, la producción de arilsulfatasas y considerados Gram positivos a pesar de la escasa penetración del colorante cuando son teñidos por medio de la técnica de Gram, efecto ocasionado por los ácidos micólicos presentes en la compleja pared celular de la que están provistos (Wayne y Díaz, 1986). En la actualidad, los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro del género *Mycobacterium* son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71% de GC en su genoma (Levy-Frebault y Portaels, 1992).

Las especies pertenecientes al género *Mycobacterium* también se clasifican en función de otras características como el tiempo requerido para la formación de colonias visibles en medio sólido. Así, los miembros del género se clasifican comúnmente en dos grandes grupos: micobacterias de “crecimiento rápido” y de “crecimiento lento”. En el caso de las primeras, la aparición de colonias visibles se produce en un período inferior a siete días y en el caso de las segundas mayor a siete días.

A su vez, la especies de “crecimiento lento” se han subdividido en tres grupos diferentes en base la producción de pigmentación visible (Timpe y Runyon, 1954): fotocromógenas (Grupo I de Runyon), escotocromógenas (Grupo II de Runyon) y no fotocromógenas (Grupo III de Runyon). Esta clasificación no tiene validez taxonómica pero sí clínica, ya que las especies de crecimiento lento son generalmente patógenas para los animales y el hombre (Tabla 1).

Tabla 1. Principales grupos de micobacterias agrupadas según el criterio de la producción de pigmento (Runyon y col. 1959).

Grupo	Velocidad de crecimiento	Especies de micobacterias
Grupo I de Runyon fotocromógenas (pigmento amarillo con luz)	Crecimiento lento (> 7 días)	<i>Mycobacterium asiaticum</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium simiae</i>
Grupo II de Runyon escotocromógenas (pigmento amarillo naranja)		<i>Mycobacterium flavescens</i> , <i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i>
Grupo III de Runyon no cromógenas (no producen pigmento)		<i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> , <i>Mycobacterium gastri</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>haemophilum</i> , <i>Mycobacterium intracellulare</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>malmoense</i> , <i>Mycobacterium terrae</i> , <i>Mycobacterium triviale</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i>
Grupo IV de Runyon no cromógenas (no producen pigmento)	Crecimiento rápido (<7 días)	<i>Mycobacterium abscessus</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium goodii</i> , <i>Mycobacterium immunogenum</i> , <i>Mycobacterium mucogenicum</i> , <i>Mycobacterium peregrinum</i> , <i>Mycobacterium senegalense</i> , <i>Mycobacterium septicum</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium wolinskyi</i>
No cultivable		<i>Mycobacterium leprae</i>

Por otro lado, los avances en el campo de la biología molecular y de la genética bacteriana han permitido a su vez la clasificación taxonómica de las micobacterias en base a los polimorfismos presentes en las secuencias de diferentes genes que se emplean como diana. Así, en la actualidad uno de los genes diana más comúnmente empleado es el gen del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S), caracterizado por tener una longitud aproximada de 1500 nucleótidos y presentar en su secuencia regiones altamente conservadas y otras regiones más hipervariables en todas y cada una de las especies de micobacterias (Boddinghaus y col. 1990).

I.2 Complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

El complejo *Mycobacterium avium* está incluido en el grupo III de Runyon y pertenece al grupo de micobacterias distintas de tuberculosis. El MAC está constituido principalmente por un grupo de micobacterias medioambientales relacionadas entre sí y en el cual se incluyen *Mycobacterium avium* subespecie *avium* (*M. a. avium*), *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*), *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis* (*M. a. hominissuis*), *Mycobacterium avium* subespecie *silvaticum* (*M. a. silvaticum*) y *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) (Inderlied y col. 1993).

Durante esta última década se han descrito nuevos miembros de MAC como *Mycobacterium chimaera* (Tortoli y col. 2004), *Mycobacterium colombiense* (Murcia y col. 2006), *Mycobacterium arosiense* (Bang y col. 2008), *Mycobacterium bouchodurhonense*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense* (Ben Salah y col. 2009).

Los miembros de este complejo MAC presentan unas características tanto genéticas como fenotípicas particulares, las cuales les permiten el crecimiento en biotipos naturales sin perder por ello su potencial patógeno. Entre estas características destacan el amplio rango de temperaturas dentro del cual son capaces de crecer (desde 20°C hasta 37°C), la capacidad de adaptación a nuevos sustratos con amplios rangos de pH, desde 4 a 7.5 (estando el pH óptimo comprendido entre 5.4 y 6.5) (Portaels y Pattyn, 1982).

MAC está distribuido de forma natural en agua y tierra. Estas bacterias también están presentes en aves, animales domésticos y salvajes, en el hombre (los cuales podrían actuar como reservorio), donde no causan enfermedad alguna a no ser que el hospedador esté debilitado o en situación de inmunodepresión. En este caso, las bacterias incluidas dentro de este complejo tienen gran importancia tanto en sanidad animal, porque originan grandes pérdidas económicas en explotaciones de aves, cerdos y vacas principalmente (Dey y Parham, 1993; Grange et al., 1990; Schaefer, 1967), como en salud pública, ya que causan infecciones generalizadas en pacientes inmunodeprimidos especialmente en enfermos con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (von Reyn et al., 2002; Young et al., 1986) siendo el agua en este caso la principal fuente de contaminación (Du Moulin y Stottmeier, 1986; Goslee y Wolinsky, 1976).

El genoma de Map

La secuenciación del genoma completo de Map, fue publicada por Li et al., (2005) la cual fue realizada a partir de la cepa referencia K-10, un aislado de origen bovino. El conocimiento de la secuencia del genoma de Map, ha posibilitado grandes avances en todos los campos de investigación de Map como estudios genómicos comparativos con relación a otras micobacterias, blancos de diagnóstico, evolución molecular de Map como patógeno, elementos genéticos específicos, etc.

El genoma de Map esta insertado en un cromosoma circular de 4.829.781 pb que codifica para 4.350 marcos de lectura abiertos u ORFs, del inglés open reading frames, 45 tRNAs, y un operón rRNA. El análisis in silico ha identificado más de 3.000 genes con homólogos en *M. tuberculosis*, y 161 regiones genómicas únicas que codifican 39 genes de Map desconocidos hasta el momento. El genoma esta caracterizado por la relativa alta proporción de guanina y citosina (69%) así como abundantes secuencias de inserción (IS) y miembros de la familia PE/PPE (dominios de prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico respectivamente), estos últimos, estan implicadas como factores de virulencia y patogénesis en las infecciones por Map (Li et al., 2005).

En el genoma de Map, se han identificado 58 secuencias de inserción, incluyendo 17 copias de IS900, 7 a 10 copias de IS1311 y 3 copias de ISMav2 (Li et al., 2005), 3 copias de ISMpa1 (Olsen et al., 2004), y 6 copias de ISMap02 (Stabel et al., 2005). Map no contiene la IS1245, característica del complejo avium (Johansen et al., 2005). Otros genes o dianas de interés específicos son el locus 251 (Bannantine et al., 2002, Motiwala et al., 2003), el hspX (Ellingson et al., 1998, 2000) y el F57 (Poupart et al., 1993) (Figura 3).

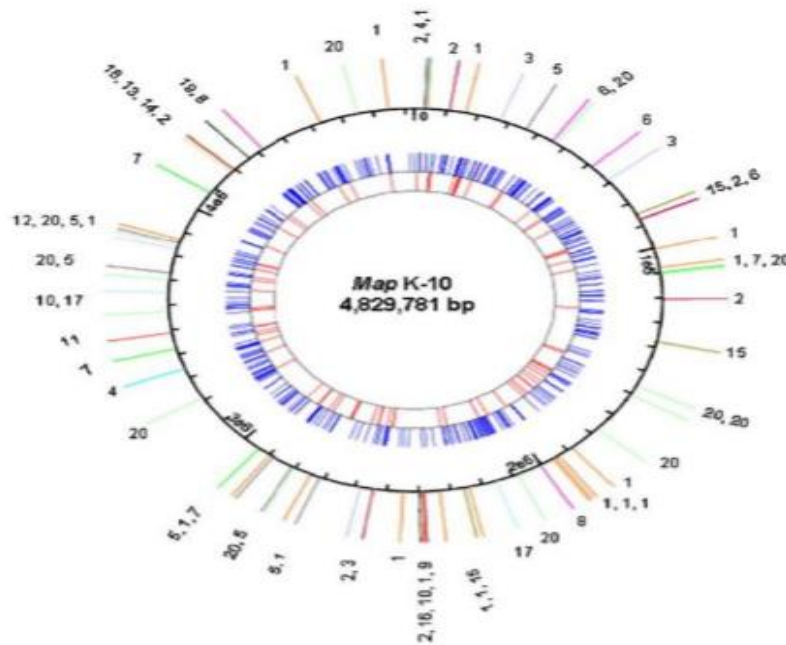


Figura 3. Representación circular de los elementos IS y secuencias repetitivas en el genoma de *Map*. Las líneas de color rojo representan los SSRs (Repeticiones de secuencias cortas), las de color azul representa los VNTRs (Repeticiones en tándem de número variable), las del círculo negro representan las escalas, los líneas de color que están por fuera del histograma son las secuencias de inserción (1: IS900; 2: IS1311; 3: ISmav2; 4: IS_MAP01; 5: MAP02; 6: MAP03; 7: MAP04; 8: MAP05; 9: MAP06; 10: MAP07; 11: MAP08; 12: MAP09; 13: MAP10; 14: MAP11; 15: MAP12; 16: MAP13; 17: MAP14; 18: MAP15; 19: MAP16; 20) (Fuente: Motiwala, 2006).

Adicionalmente, el conocimiento del genoma de *Map* está proporcionando nueva información acerca de regiones genéticas únicas de la bacteria, que además de servir para la identificación y el diagnóstico, permitirán revelar los procesos genéticos de la interacción patógeno-hospedador (Li et al., 2005, Marsh et al., 2006, Bannantine et al., 2006).

Secuencias de inserción (Insertion sequences, IS)

Las secuencias de inserción son repeticiones de ADN dispersas, relacionadas con elementos genéticos móviles presentes en múltiples copias (Hatfull y Jacobs, 2000).

La movilidad de estos elementos constituye una fuente de flexibilidad genética, siendo responsables a su vez, de una gran variedad de reestructuraciones cromosómicas además de deleciones (Mahillon y Chandler, 1998). La utilización de las secuencias de inserción en pruebas de diagnóstico, proporciona discriminación entre distintas especies, debido a la tendencia de estos elementos transponibles para insertarse al azar y ocupar varios sitios en el genoma. En algunos casos la localización de estos elementos de inserción, en lugares definidos del genoma son lo suficientemente estables para ser utilizados como marcadores para la tipificación de

especies y para fines epidemiológicos (Dombek et al., 2000). En el caso particular de Map las secuencias de inserción más comúnmente utilizadas para su identificación y tipificación son las secuencias IS900 e IS1311, las cuales están descritas detalladamente en el apartado de Diagnóstico molecular de Map, página 38.

Diversidad de las cepas de Map

Observaciones fenotípicas así como estudios epidemiológicos y moleculares, han evidenciado la heterogeneidad en los distintos aislamientos de Map. Los cuales se han clasificado ampliamente en dos grandes grupos o tipos de cepas, las bovinas y las ovinas. Esta diferenciación fue realizada por primera vez mediante el análisis de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism analysis, RFLP) en combinación con la hibridización de IS900, (IS900RFLP) (Collins et al., 1990, Pavlic et al., 1999). Inicialmente la denominación de los tipos de Map, se hizo de acuerdo a las especies en las cuales fueron aisladas en: cepas ovinas o Tipo “S” (Type sheep) aisladas de ganado ovino, cepas bovinas o Tipo “C” (Type cattle) obtenidas de animales de origen bovino, y Tipo intermedio o “I” aisladas de pequeños rumiantes (Collins et al., 1990). Posteriormente se encontró que los tipos de Map pueden también ser aislados de diferentes especies y que por lo tanto, las especies de origen no son necesariamente un indicador adecuado del tipo de cepa. Por lo tanto se propuso denominar a estas cepas como: Tipo I (que corresponde al Tipo S), Tipo II (correspondiente al Tipo C) y Tipo III (o Tipo Intermedio) (Stevenson et al., 2002, de Juan et al., 2005).

Los avances en las técnicas de tipificación molecular han hecho posible la diferenciación genética entre los distintos aislamientos de Map, así como la identificación de otras cepas de este organismo. Mediante la utilización del ensayo IS1311 PCR-REA, se logró identificar además de las cepas ya descritas, otro tipo de cepa obtenida a partir de muestras de bisontes, denominándosele Tipo B (Type bison), (Whittington et al., 2001, Sohal et al., 2009). Un estudio reciente de comparación genómica de Map, ratificó la división de Map en los dos grandes grupos propuestos inicialmente, los Tipos I y II pero debido a que en este estudio no se encontró diferencias que delimitaran al tercer grupo, es decir al Tipo III o intermedio, se hizo un agrupamiento que incluyó a las cepas del Tipo III con las cepas del tipo I, conformándose el Tipo I/III. Esta agrupación es consistente con la observación de que las cepas del tipo I y las del tipo

III comparten rasgos fenotípicos similares así como las preferencias por el huésped (Alexander et al., 2009).

A nivel epidemiológico parece existir cierta tendencia de los tipos de Map a asociarse con aspectos como la transmisión, preferencia por el huésped y susceptibilidad a la infección; sin embargo las distintas metodologías empleadas en los diferentes estudios publicados sobre aislamiento y tipificación de Map, han hecho difícil el entendimiento de estas asociaciones. No obstante, existen evidencias fenotípicas y genotípicas que diferencian a las cepas de Map. Fenotípicamente se distinguen por el tiempo en que tardan en crecer, el tipo de medio de cultivo en donde se pueden aislar (estos aspectos se ampliarán en el apartado de El cultivo de Map, página 32) y otra característica aunque poco común, es la pigmentación que presentan algunas cepas de origen ovino y que no ha sido observada en las cepas bovinas (Stevenson et al., 2002).

A nivel genotípico se han encontrado algunas diferencias entre las cepas del Tipo I y II. Un estudio realizado por Dohmann et al., (2003), encontró que estos dos tipos de cepas no tienen locus tipo-específicos únicos, y que las cepas del tipo II parecen haber sufrido más deleciones y rearrreglos de regiones genómicas que las del tipo I. En las cepas del tipo I se han encontrado 3 regiones específicas denominadas pig-RDA10.

2.4 Epidemiología de la paratuberculosis

La epidemiología de la ptb está ligada a las características biológicas de Map tales como el lento desarrollo, el parasitismo obligado, la alta resistencia ambiental, la posibilidad de infección congénita y la transmisión a través del medio ambiente contaminado. La implicación de este microorganismo en la ptb, fue descrita por primera vez por Johne y Frothingham (1895).

Aunque la ptb afecta principalmente a rumiantes domésticos, esta enfermedad también ha sido descrita en rumiantes no domésticos como ciervos, búfalos, bisontes, muflones, cimarrones, cabras de montaña etc. (Mackintosh et al., 2004, Sivakumar et al., 2005, Whitlock et al., 1999, Richards et al., 1983). Así como también a especies monogástricas como: conejos, caballos, cerdos, mulas, perros, pollos, primates y el hombre (Hermon- Taylor y El-Zaatari, 2004; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

Mycobacterium paratuberculosis, ha sido señalado como agente etiológico de la enfermedad de Crohn en humanos (Dalziel et al., 1913, Rosenfeld et al., 2010), enfermedad que consiste en una inflamación crónica del intestino (íleon y el área ileocecal) (Anderson et al., 1980, Chiodini et al., 1997). Lo anterior es debido a que Map ha sido aislado en muestras de

tejidos intestinales y de sangre periférica de estos pacientes (Hulten et al., 2001, Naser et al., 2004, Bentley et al., 2008), así como de leche materna de mujeres que padecen la enfermedad (Nacer et al., 2000b), en donde también ha sido identificado por medio de PCR (Bull et al., 2000, Autschbach et al., 2005). Sin embargo, otros autores son escépticos a esta asociación debido a que han encontrado resultados contradictorios como por ejemplo, la extrema dificultad y en algunos casos la imposibilidad de aislar la bacteria a partir de muestras de estos pacientes (Collins et al., 2000), el aislamiento de Map en individuos sanos (Bull et al.,

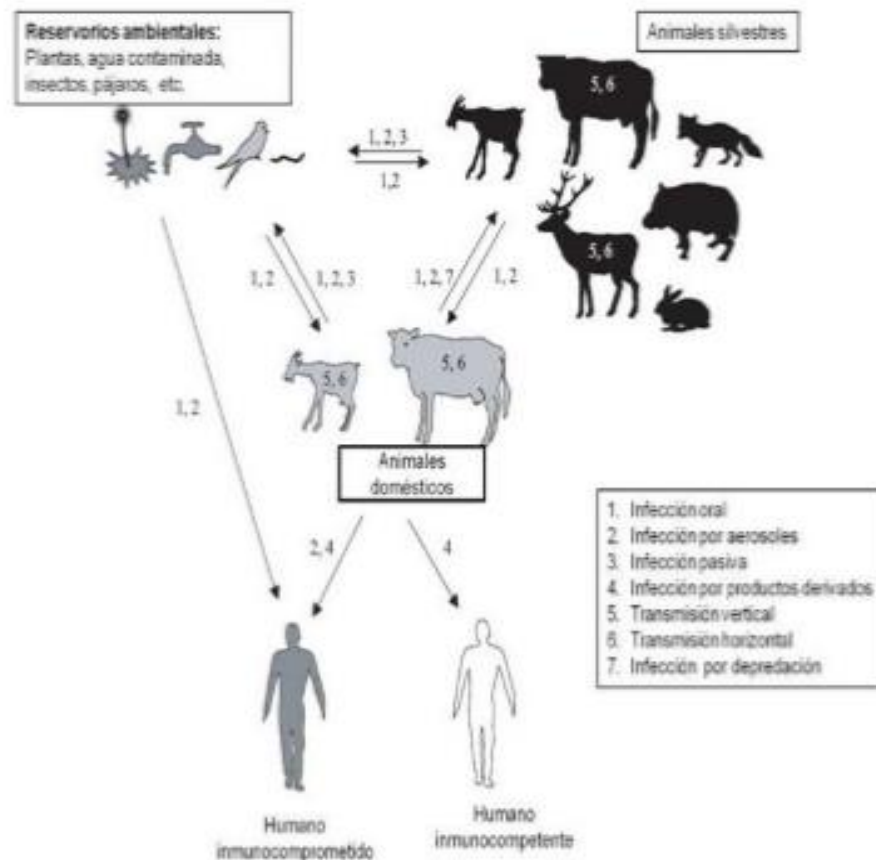


Figura 4. La ilustración muestra las posibles vías de transmisión de los miembros de MAC, entre el medioambiente, los animales salvajes, el ganado y el humano. (Figura adaptada de Biet *et al.*, 2005). La transmisión vertical se da por vía intrauterina y la horizontal por contaminantes del medio ambiente (heces, aerosoles, etc.)

Prevalencia de la paratuberculosis

La ptb presenta una distribución mundial y es reconocida como un serio problema de salud animal ya que afecta a distintas especies de rumiantes de importancia agropecuaria como ganado de carne y de leche, ovinos y caprinos (Whittington et al., 2000b). Esta enfermedad tiene el mayor impacto económico en el ganado vacuno de leche, donde el sacrificio prematuro reduce considerablemente la producción de este.

Un producto así como el valor de la canal. El departamento de agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA), ha estimado que en este país, aproximadamente el 22% del ganado vacuno lechero y el 8% del ganado de carne está afectado por la ptb, ocasionando grandes pérdidas que han sido estimadas hasta en \$ 250 millones de dólares anuales tan solo en la industria láctea (Whitlock et al., 2000, Hendrick et al., 2005, Tiwari et al., 2008). Sin embargo, los verdaderos efectos económicos ocasionados por la ptb así como las prevalencias a nivel mundial, son difíciles de estimar por las siguientes razones:

1. La mayoría de los animales infectados son asintomáticos, 2. Los animales en estadios clínicos y que presentan disminución en la producción, son sacrificados antes de que se les realice el diagnóstico definitivo de la enfermedad, y 3. Las dificultades en el diagnóstico de la infección temprana (baja sensibilidad de las técnicas de detección) (Fecteau y Whitlock, 2010).

En ganado ovino, la prevalencia de la ptb es desconocida mundialmente, debido a que no es de notificación obligatoria en muchos países, su estudio presenta menor prioridad en comparación con la ptb en ganado bovino, las dificultades en el aislamiento de Map, la falta de técnicas de diagnóstico lo suficientemente sensibles y específicas. En resumen el alto costo de la detección de la enfermedad en comparación con el bajo valor comercial que estos animales tienen. La ptb ovina se ha reportado en países de Norte América, Suramérica, Australasia, países del este, Asia, África y Europa, en donde la prevalencia de la enfermedad difiere entre el 2-32% (Bakker et al., 2000; Sergeant 2001; Nielsen y Toft, 2009). Aunque en rebaños ovinos la prevalencia de Map no ha sido estudiada detalladamente, algunos estudios reportan una tasa de mortalidad que va del 5-15% por año (Reddacliff et al., 2006).

En ganado caprino la prevalencia de la ptb también ha sido difícil de estimar, por razones similares a las mencionadas en el caso de la especie ovina. El principal problema que ocasiona la ptb en esta especie se relaciona con las pérdidas.

Prevalencia de la paratuberculosis en México

En México, la ptb es una enfermedad de gran impacto económico ya que junto con la tuberculosis bovina, la brucelosis y la infección por garrapatas, contribuye a la disminución en la producción ganadera.

En un estudio realizado en el 2005, sobre el impacto económico de la ptb en bovinos lecheros del centro del país, se calcularon pérdidas de \$10,345.00 pesos por vaca al año, con una prevalencia del 8.87% en una población de casi 30,000 bovinos, siendo la disminución en la producción de leche el factor más desfavorable (CONASA, 2010).

Por otro lado, la utilización de pruebas diagnósticas como anatomía patológica, serología, bacteriología y técnicas de biología molecular como PCR y RFLP (ChávezGris et al., 2004, Estévez-Denaives et al., 2007, Favila-Humara et al., 2010), han permitido detectar la enfermedad en 16 estados del país y en distintas especies de rumiantes, encontrándose prevalencias del 9% en ganado bovino, 19.72% en caprinos y 36% en ovinos, en pruebas realizadas en más de 7000 muestras (CONASA 2010) (Figura 5). Sin embargo, a pesar de estos datos la prevalencia real de la paratuberculosis en el país sigue siendo desconocida y aun no han llevado a cabo programas de control de la enfermedad (Favila-Humara et al., 2010).

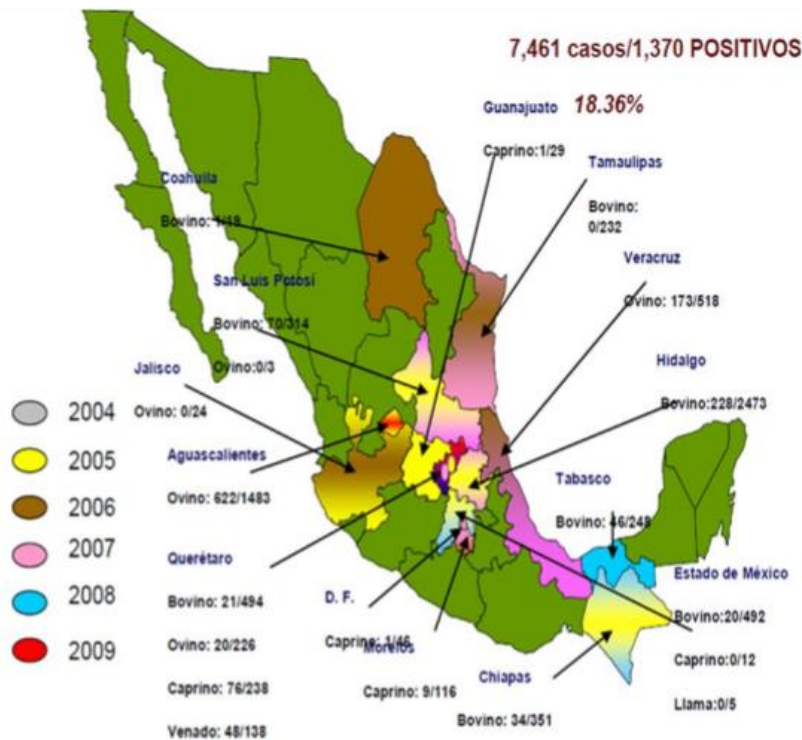


Figura 5. Casos de Paratuberculosis en México 2004—2009 (ELISA). Fuente: Dr. Gilberto Chávez Gris. FMVZ/CEIEPAA, USEDICO, UNAM. 17ª Reunión Anual del CONASA.

Signos clínicos de la paratuberculosis

La ptb se caracteriza por ser una enfermedad que progresa a través de varios estadios, tardando varios años antes de que se manifiesten los signos clínicos característicos (Olsen et al., 2001). Las fases en las que se desarrolla la ptb, son similares para las especies bovinas, ovinas y caprinas, aunque la presencia de algunos signos como la diarrea, es menos frecuente en pequeños rumiantes, así como la aparición de la enfermedad, la cual se da en animales más jóvenes (Stehman 1996). Las fases o estadios en las que se ha dividido la ptb son cuatro:

28

Fase I. Infección silenciosa. Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de la enfermedad y la no excreción del microorganismo. Esta etapa de infección se encuentra presente fundamentalmente en terneros y novillas, aunque en ocasiones también se ha descrito en ganado adulto.

Fase II. Fase subclínica. La mayoría de los animales infectados en una explotación están en esta fase. Los cuales no muestran signos evidentes de la enfermedad, aunque sí lesiones microscópicas (Pérez et al., 2000), también pueden presentar anticuerpos circulantes o respuestas inmunes celulares alteradas. En esta fase los animales comienzan a perder productividad, en el caso de los bovinos se disminuye la producción de leche que puede variar entre el 4-14% (Wilson et al., 1997), adicionalmente en esta etapa se observa la aparición de síntomas inespecíficos como la disminución de la fertilidad y la mastitis (Valentin-Weigand et al., 1999). La gran mayoría de los animales son negativos al cultivo de heces, aunque estos pueden comenzar a excretar la bacteria de manera intermitente con una baja carga microbiana.

Fase III. Fase clínica. Esta fase sólo se desarrolla tras varios años de infección por Map, en bovinos puede comenzar entre 3-4 años y en pequeños rumiantes el inicio de la enfermedad puede empezar antes de los 2 años; en ambos casos esta fase coincide con los partos y el inicio de la lactancia (Manning y Collins., 2001, García Marín et al., 1994). Los signos clínicos característicos que se presentan son: diarrea intermitente que afecta especialmente a los bovinos, la cual no responde a tratamientos, y que se puede relacionar con la baja capacidad de la mucosa intestinal de retener nutrientes. En ovinos y caprinos no es común la presencia de diarrea, aunque esta puede aparecer en algunos casos en la fase final de la enfermedad, cuando las lesiones afectan ampliamente el intestino. Muchas veces estas heces son de consistencia pastosa o reblandecida (Carrigan et al., 1990, García Marín et al., 1994). Otros signos característicos son:

pérdida de peso, emaciación y caquexia, los cultivos fecales de estos animales son positivos y usualmente presentan incrementados títulos de anticuerpos detectables por pruebas serológicas.

FASE IV

A esta fase pertenecen los animales en estado clínico avanzado, cuyas características principales son, debilidad, emaciación, diarrea acuosa profusa, caquexia extrema, edema intramandibular y deshidratación, que conducen a la muerte del animal (Choidini et al., 1984, Pérez et al., 2000,).

2.5 Patogénesis de la enfermedad

La principal vía de infección por Map es la oral, a través de su ingestión. El sitio de infección primaria de esta bacteria son las mucosas intestinales, aunque algunos estudios hayan indicado que son las amígdalas y los ganglios retrofaríngeos, (Payne y Rankin 1961, Lugton 1999), sin embargo estas parecen ser transitorias y desaparecen sin ocasionar trastornos (García Marín et al., 2000). La mayor susceptibilidad a la infección por Map, se presenta en animales menores a 1 año, posiblemente debido a la extensa superficie que abarcan las placas de Peyer intestinales en animales jóvenes, la cual va reduciéndose gradualmente con la edad.

El blanco de Map son los tejidos linfoides del hospedador asociados a las mucosas del tracto gastrointestinal superior del intestino, donde es endocitado por las células M epiteliales (mediado por receptores de integrina y fibronectinas (Sigurdardottir et al., 2005, Secott et al. 2004)), que recubren las cúpulas de las placas de Peyer del íleon y yeyuno, y posteriormente es fagocitado por los macrófagos subepiteliales e intraepiteliales (Momotami et al., 1988, Lugton 1999). No obstante, parece ser que las células M no son el único sitio de entrada de Map, al menos en cabras, ya que se ha encontrado que en esta especie de animales, la entrada de Map a la mucosa intestinal está restringida a los enterocitos yeyunales no asociados a las placas de Peyer (Sigurdardottir et al., 2005).

Map se localiza y reside preferentemente en los fagosomas o endosomas inmaduros de los macrófagos del hospedador, con predominio de aquellos asociados a las placas de Peyer ileales y yeyunales (Momotani et al., 1988, Pérez 1992, Corpa et al., 2000). Los macrófagos epiteliales activados, estimulan a las dos subpoblaciones celulares (Th1 y Th2) de las células T

ayudadoras (T helper, Th) que a su vez estimulan diferentes tipos de respuestas inmunes en el huésped. La infección por Map parece seguir los patrones observados en *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*; estos patrones implican una respuesta inmune inicial de tipo celular (Th1) o tuberculoide, en donde la producción de citoquinas causan la formación de un granuloma intestinal para contener la infección (Coicito et al., 1994, Lugton, 1999). La respuesta Th1 también se caracteriza por la producción de gama interferón (INF γ), una de las primeras citoquinas detectables en infecciones por Map, así como la interleucina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), estas citoquinas dirigen las funciones inmunitarias mediadas por células que son necesarias para contener la infección intracelular.

Los bacilos de Map, son capaces de sobrevivir intracelularmente inhibiendo la acidificación del fagosoma e impidiendo su maduración a fagolisosoma (Cheville et al., 2001). Map es resistente a la degradación por las enzimas lisosómicas, el óxido nítrico y demás mecanismos bactericidas que producen los macrófagos, debido entre otros mecanismos, a su envoltura celular lipídica (Zhao et al., 1997, Harris y Barleta 2001, Tessema et al., 2001). Durante la etapa subclínica temprana de la infección por Map, la actividad de la respuesta celular Th1 parece predominar. Esta etapa puede durar meses o años, durante el cual los bacilos permanecen microscópicos dentro de los macrófagos y granulomas; las células T de memoria y su respuesta es requerida para controlar la diseminación y el daño del tejido ocasionado por la infección; debido a esto se cree que este tipo de respuesta es protectora. A medida que la enfermedad avanza, la respuesta inmune celular disminuye, reflejando un cambio en el tipo de respuesta de Th1 a Th2 (Chiodini 1996). Cuando los animales entran a la etapa de infección lepromatosa o Th2, comienzan a manifestar signos clínicos inespecíficos de la infección por Map, tales como pérdida de peso, en algunos casos diarrea y excreción intermitente de la bacteria (Koets et al., 1990).

El cambio de respuesta inmune de Th1 a Th2, se ha asociado con la progresión de la ptb del estado subclínico al clínico (Stabel 2010). Th2, estimula la producción de las citoquinas reguladoras IL-4, IL-5 e IL-10, las cuales activan la respuesta inmune humoral caracterizándose por la expansión de los linfocitos B, la secreción de inmunoglobulinas y el control de la respuesta mediada por Th1. A diferencia de la respuesta celular, el tipo de respuesta humoral no es protectora y no detiene la progresión ni la patología de la infección.

Diagnóstico microbiológico de la paratuberculosis

Tinción directa

Se realiza sobre frotis obtenidos a partir de preparaciones de cortes histológicos o de heces, que son teñidos por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen. La técnica se basa en la retención del colorante fucsina por bacterias ácido-alcohol resistentes, en las que el decolorante (ácido-alcohol) no penetra debido a la gruesa pared celular que las recubre. A pesar de que esta técnica es rápida y económica, no se considera específica de Map (Juste y Aduriz 1990).

El cultivo de Map

El aislamiento de Map es considerado la técnica de referencia para el diagnóstico de la ptb en animales vivos. El primer aislamiento de Map lo realizó Twort (1911), desde entonces se ha tratado de mejorar la técnica del cultivo, con el objetivo de hacerlo más rápido, eficaz y sensible. Las muestras normalmente utilizadas para el cultivo de Map son: heces, ganglios mesentéricos o raspados de mucosa intestinal y leche (Garrido et al., 2000a). El cultivo fecal es capaz de detectar a la mayoría de los animales en avanzado estado de la enfermedad donde alcanza una sensibilidad del 100%, pero solo a unos cuantos en las fases iniciales de la infección (Whitlock et al., 2000a). Se considera que su especificidad es del 100% (Whitlock et al., 1992, OIE 2008) y su límite de detección es de 50 a 100 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces (Whitlock et al., 2000). El crecimiento de una o más colonias de Map es suficiente para definir una muestra como positiva, así como la detección de un solo animal con ptb dentro de un rebaño, es suficiente para clasificar al hato como infectado (Kalis et al., 2000).

Los requerimientos nutricionales para el cultivo de Map son similares a los de las micobacterias en general, con la salvedad del suplemento de micobactina como ya se había mencionado. Además, existen algunos componentes que pueden potenciar el crecimiento de Map como son la albumina sérica bovina y la yema de huevo, cuyo efecto más que aportar nutrientes radicaría en la eliminación o neutralización de compuestos deletéreos presentes en el medio. El dióxido de carbono y la asparagina (Ratledge 1982), el glicerol y el piruvato como fuentes de carbono, favorecen igualmente su crecimiento. Los antibióticos como la penicilina y antifúngicos como la anfotericina B (Kalis 1999), son necesarios ya que en las muestras fecales y de tejido intestinal, los microorganismos de Map pueden estar enmascarados por otras bacterias y hongos. Por consiguiente, el aislamiento efectivo de Map a partir de tales muestras dependerá de la eficacia en la inactivación de los microorganismos no deseados. Un método óptimo de

descontaminación debe tener el menor efecto inhibitorio posible sobre el crecimiento de Map. Se ha encontrado que los protocolos rutinarios de descontaminación pueden disminuir el número de microorganismos de Map en cantidades cercanas a 2.7 log₁₀ en heces y 3.1 log₁₀ en tejidos (Reddacliff 2003).

En cuanto a las preferencias por los medios de cultivo de las distintas cepas de Map, se ha encontrado que estas estarían determinadas por el genotipo y no por la especie hospedadora (Sevilla 2007). En este sentido, se ha reportado que el medio más propicio para aislar cepas del Tipo II es el Herrold (Juste 1991b, Nielsen 2004). Mientras que para aislar cepas del Tipo I/III el medio más favorable es el Lowenstein Jensen (LJ) sin piruvato (Juste 1991, Aduriz 1995, Whittington 2000a). Sin embargo, debido a que no es posible determinar el tipo de cepa con anticipación, es recomendable la utilización de diferentes medios. Otro factor que está relacionado con el tipo de cepa es el periodo de incubación, el cual para cepas de origen bovino puede tardar entre 4-16 semanas y hasta un año en cepas de origen ovino (Whittington 1999). Así, el periodo de incubación de Map también es dependiente del tipo de cepa y no del origen del huésped (de Juan 2006).

En la búsqueda de estrategias para reducir los altos costos que conlleva el cultivo bacteriológico (20 dólares por muestra), se ha encontrado que una buena alternativa es el cultivo a partir de lotes o “pool” de heces, el cual ha resultado ser muy útil como método de estimación de la prevalencia de la ptb en un rebaño (Whittington 2000a, Kalis 2004), aunque ineficaz a la hora de identificar animales infectados dentro de un programa de control ya que la dilución del número de microorganismos de Map presentes en la muestra individual, reduce la sensibilidad de la técnica. No obstante, se ha encontrado que la reducción observada en el recuento de colonias en un pool de heces es mucho menor de lo que se podría esperar y que esto se atribuiría a una concentración de Map durante el procesamiento y descontaminación de las muestras; por lo tanto con una eficiente técnica de concentración como la centrifugación, sedimentación o filtración, la dilución de las muestras fecales no influye en el número de colonias totales (Kalis et al., 2000).

1. JUSTIFICACIÓN

La inmunopatología de la paratuberculosis es compleja al igual que otras enfermedades causadas por micobacterias como la tuberculosis humana y la tuberculosis bovina; el metabolismo del hierro de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* juega un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad.

La familia de proteínas Fur Los resultados que se obtengan de este trabajo servirán para proponer otros protocolos de investigación que nos permitan demostrar la regulación en el metabolismo de hierro, además pretendemos utilizar la información para proponer el uso de la proteína en diagnóstico y como posible vacuna que pueda ayudar a en el tratamiento de la paratuberculosis. Los resultados de la investigación serán mostrados a la comunidad científica para su conocimiento y uso

Los macrófagos no son capaces de eliminar a la micobacteria ingerida, por lo que la infección persiste y continúa por años, pero sin presentación de signos de la infección. Los animales crónicamente infectados comienzan a eliminar las bacterias por las heces fecales a los 2 años de edad o más. La enfermedad progresa a una etapa clínica hasta signos como pérdida de peso y diarrea. Finalmente la enteropatía puede ser fatal por la pérdida de proteínas (5, 6,7). En la paratuberculosis, se ha estudiado que después de la infección inicial se activa el sistema de inmunidad mediado por células, seguido por la etapa de la infección latente subclínica con la inmunidad celular leve, terminándose las etapas subclínicas con excreción de MAP y desarrollo de síntomas clínicos y con la inmunidad humoral aumentada. Se conoce que la supresión de inmunidad celular es por vía IL-10, pero la causa de transición de inmunidad celular a humoral así como los eventos inmunopatológicos que provocan el desarrollo de síntomas clínicos aún quedan desconocidos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* presenta características bioquímicas de la familia de proteínas Fur y es capaz de autorregular su expresión.

2.2. Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* y demostrar la autorregulación de su expresión autorregulación *in vitro*.

2.3. Objetivos específicos

1. Obtener dos sondas de ADN que contengan las cajas de hierro de la región promotora del gen *map3773c* de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* ATCC 19698 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para poder utilizarlas en una ensayo EMSA.
2. Purificar, cuantificar y digerir el plásmido pRSET-MAP3773c contenido en una cepa de *Escherichia coli* DH5α.
3. Transformar una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c y sobreexpresar la proteína recombinante usando IPTG como inductor.
4. Purificar y cuantificar la proteína MAP3773c.
5. Caracterizar parcialmente la proteína MAP3773c.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de Sondas de ADN de las Cajas de Hierro

3.1.1. Alineamientos de Secuencias Nucleotídicas

Primero se procedió a buscar cajas de hierro en la secuencia promotora del gen de map3773c utilizando el software **Geneious**. Se realizó un primer alineamiento de la región promotora del gen map3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) cepa K-10, utilizando la secuencia del genoma depositada en el *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (AE016958.1), con la caja de hierro de *Escherichia coli* y la caja de hierro consenso de todas las bacterias:

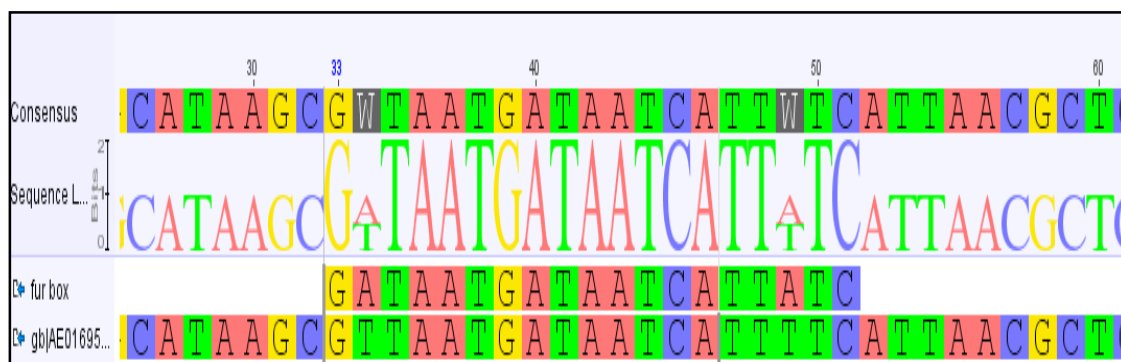


Tabla 1. Primer alineamiento de cajas de hierro. *Consensus:* Secuencia nucleotídica de la caja de hierro consenso de todas las bacterias. *Sequence L.:* Secuencia nucleotídica coincidente (letras mayúsculas) del alineamiento de las tres secuencias. *fur box:* Secuencia nucleotídica de la caja de hierro de *E. coli*. *gbJAE01695:* Secuencia nucleotídica correspondiente a la región promotora del gen map3773c de MAP.

Se realizó un segundo alineamiento de la región promotora del gen map3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) cepa K-10 con las cajas de hierro **reportadas** de las siguientes micobacterias:

<i>M. tuberculosis</i>	AGTCTTGACTGATTCCAGAAAAG
<i>M. bovis</i>	AGTCTTGACTGATTCCAGAAAAG
<i>M. smegmatis</i>	ATTCTTGACTAATTCCAGAAAAG
<i>M. fortuitum</i>	TATCTTGACTGATTCCAGAAAAC

Tabla 2. Cajas de hierro de bacterias del género *Mycobacterium*.

3.1.2. Diseño de Oligonucleótidos Sintéticos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el software *Geneious* y *Primer3 Output* usando la secuencia de la región promotora del gen map3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) cepa K-10, y se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos Sintéticos Utilizados.

Oligonucleótidos para Amplificación de Cajas de Hierro						
Nombre	#	Lote	Secuencia (26 nucleótidos)	Tm (°C)	Concentración (pMolar)	Caja de hierro que amplifica
FCAHIER - MAP3773 C	106 5	0203015	GAG,CTC,AAC,G CG,GAA,GTG,AC G,AGT,AA	70.6	131	Consenso de micobac- terias
RCAHIER - MAP3773 C	106 6	020315	AAG,CTT,GCG,C TT,CGA,AAG,TT C,TCT, TG	68.0	158	
FCAHIBA -	854 6	092215	GAG,CTC,GGA,G GG,GCG,TAG,AA	73.2	210	Consenso de todas

CTERIAS			C,TCT,GT			las
RCAHIB	854	092215	AAG,CTT,GTG,A	70.6	183	bacterias
A-CTERIAS	7		GG,ACT,CGG,CGT,TAG,GA			

3.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó la siguiente mezcla de reactivos para realizar la técnica de la PCR en un volumen final de 25 µL por reacción (Tabla 3), estandarizada por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Como plantilla para la amplificación de las cajas de fierros con la PCR se utilizó un suspensión de células de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* ATCC 19698 en agua grado biología molecular inactivadas a 100 °C por 15 minutos.

Reactivos	Volumen para 1 reacción
Mezcla de dNTP's (concentración final de 10 mM)	1.5 µL
Búffer 10X (concentración final de 1X)	2.5 µL
Oligonucleótido <i>Reverse</i>	2.5 µL
Oligonucleótido <i>Forward</i>	2.5 µL
Dimetilsulfóxido	1.25 µL
Agua grado biología molecular	12.25 µL
<i>Taq</i> polimerasa	0.5 µL
ADN/Células plantilla	2 µL

Tabla 3. Reactivos para la PCR.

3.1.4. Electroforesis de los Productos de PCR

Para observar la correcta amplificación de los fragmentos de ADN deseados en la técnica de PCR se procedió a correr 10 μ L producto obtenido mezclado con 2 μ L de búffer de carga 6X en una electroforesis en gel de agarosa al 2.0 % con bromuro de etidio **X concentración** en presencia de búffer **TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA)**, 100 Volts, durante 30 - 45 minutos.

3.1.5. Purificación y Cuantificación de las Sondas de ADN

Para obtener bastante cantidad de ADN producto (sondas de cajas de hierro) se procedió a purificar a partir 25 de reacciones de la PCR; todas estas se mezclaron en un solo tubo, se centrifugaron 15 minutos a 13,000 rpm para recuperar el sobrenadante y se descartar el precipitado (células de micobacterias).

Posteriormente para eliminar proteínas se utilizó 1 mL de la fase inferior de la solución originada por la mezcla de fenol (50 partes) / cloroformo (49 partes) / alcohol isoamílico (1 parte) a los aproximadamente 500 μ L que se obtuvieron después de la centrifugación, después se procedió a homogenizar muy bien en un vórtex y centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm, finalmente se recuperó la fase acuosa (superior) sin desprender nada del anillo intermedio formado (tiene proteínas).

Enseguida se hizo la precipitación de ADN mezclando 450 μ L de etanol 100 % y 50 μ L de acetato de sodio 3 M por cada 100 μ L de solución con ADN a purificar, luego se incubo por 16-18 horas a -20 °C (temperatura de congelación); posteriormente se centrifugó 10 minutos a 13,000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante (cuidando no perder el precipitado blanco de ADN), se procedió a hacer 2 lavados con etanol al 70 % y centrifugando 5 minutos a 13,000 rpm, finalmente el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente (aproximadamente 1 - 2 horas) y se resuspendió en 40 μ L de agua grado biología molecular.

Para verificar la no perdida del ADN (sondas de con cajas de hierro) y su correcta purificación se realizó de nuevo una electroforesis en gel de agarosa con las mismas indicaciones del punto 4.1.4, finalmente se cuantificó por espectrofometría de absorción molecular

ultravioleta-visible haciendo lecturas a 230, 260 y 280 nm con un espectrofotómetro UV-Visible Beckman Coulter.

4.2 Obtención del plásmido pRSET-MAP3773c

4.2.1 Identificación de la cepa *Escherichia coli* DH5 α – pRSET-MAP3773c por PCR y purificación del ADN plasmídico.

Para expresar la proteína MAP3773c se utilizó el plásmido pRSET-MAP3773c (pRSET-A de *Invitrogen*TM, para una alta expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*) clonado por la M.C. Vanessa López en su trabajo de tesis de maestría (Enero 2015) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Campus Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California.

Se tomó un cultivo líquido con la cepa *Escherichia coli* DH5 α – pRSET-MAP3773c (genotipo de la cepa *Escherichia coli* DH5 α , para conservar y mantener plásmidos, de *Invitrogen*TM: *F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-*) y se le realizó un PCR a las células bacterianas (previamente lavadas con agua estéril) para verificar que traen el plásmido con el inserto de interés (*map3773c*), se utilizaron los oligonucleótidos sintéticos diseñados por la M.C. Vanessa López:

Forward: 5'GAGCTCGTGTCATCGCCCGCTGCG 3'
Reverse: 5' AAACCTTTCACGGTTGTGTGTTTTG 3'

De igual forma se utilizaron las mismas condiciones de temperatura en el termociclador reportadas:

Temperatura	Tiempo
94 °C	10 minutos
94 °C	30 minutos
63 °C	30 minutos
72 °C	30 minutos
30 repeticiones de las condiciones anteriores	
72 °C	10 minutos
4 °C	----

Enseguida se procedió a cultivar la cepa en 10 mL de caldo Luria Bertani estéril (NaCl 5.0 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L, triptona 10.0 g/L, pH 7.2 $\pm$ 0.2) con una concentración final 100 μ g/mL de ampicilina, 14-16 horas a 37 °C y con agitación mecánica de 200 rpm. Después se recolectaron las células de bacterias cultivadas centrifugando 5 minutos a 13,000 rpm y se purificó el ADN plasmídico a partir de ellas utilizando el kit *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*, *Sigma-Aldrich®* (PLN350-1KT, Batch #: SLNN5822), eluyendo con agua grado biología molecular de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Finalmente se corrió una electroforesis en gel de agarosa con las mismas indicaciones del punto 4.1.4, para verificar que se purificó con éxito el plásmido.

4.2.2 Cuantificación y digestión del plásmido MAP3773c.

La concentración de ADN plasmídico se realizó mediante espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible haciendo lecturas a 230, 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro *NanoVue Plus* (Version 4282 V2.0.4, Serial Number: 106120) *General Electric Healthcare*.

El plásmido pRSET-MAP3773c fue secuenciado en el trabajo de tesis de maestría del M.C. Jorge Arámburo Guerrero (Enero 2016) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Campus Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California, y la secuencia codificante del gen map3773c fue traducida *in silico* con el software Ape-A plasmid Editor v2.0.49.10[©] by M. Wayne Davis:

ORF	Del 46 al 579
Tamano de la traduccion	177 a.a.
Peso Molecular	20569.69 Da
Secuencia en Aminoácidos	MRGSHHHHHHGMASMTGGQQ MGRDLYDDDDKDRWGSELVS SPAAPRRRRATVKQRTVLEV LRAQENFRSAQQLYQDIRQN QQLRIGLTSVYRILRALAAD RIAETQRAEDGEILYRLRTE AGHRHYLLCRQCGRVAFTP VDIEEHTRRLSRQHHYADV T HYVDLYGTCPLCQNTQP*

Al plásmido pRSET-MAP3773c se le realizó una digestión con enzimas de restricción, usando las mismas que se utilizaron en su clonación y que permiten verificar la presencia del inserto de interés y así complementar la secuenciación realizada previamente. Se utilizaron las enzimas Sac I y HindIII de *New England BioLabs® Inc.*, realizando la reacción de digestión a 37 °C por 2 horas, la mezcla de reactivos fue la siguiente:

Reactivos	Volumen para 1 reacción
Enzima Sac I	0.25 µL
Enzima Hind III	0.25 µL
Búffer 10X	1.25 µL
Agua grado biología molecular	8.25 µL
ADN plasmídico (pRSET-MAP3773c)	2.5 µL
Total	12.5 µL

El ADN plasmídico después de ser digerido se corrió en una electroforesis en gel de agarosa con las mismas indicaciones del punto 4.1.4, para observar el patrón de digestión,

4.3 Obtención de una cepa transformada de *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c usando células quimiocompetentes.

4.3.1 Preparación de células quimiocompetentes y transformación.

Esta parte se realizó con el protocolo proporcionado por el Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, España:

A. Preparación de células quimiocompetentes:

- 1.- A partir de una colonia de *Escherichia coli* BL21 (DE3) en agar LB con 18-24 horas de incubación a 37 °C realizar un cultivo en 10 mL de caldo LB estéril e incubando igualmente a 37 °C con agitación mecánica de 200 rpm por 14-16 horas.
- 2.- Inocular en 200 mL de caldo LB estéril con 1 %(2 mL) de cultivo líquido estéril del punto anterior, incubar a 37 °C con agitación mecánica de 200 rpm hasta llegar a la

lectura de densidad óptica de 0.35-0.45 (fase logarítmica a 600 nm (tarda aproximadamente 2 horas).

3.- Detener el crecimiento del cultivo en hielo durante 20 minutos.

4.- Centrifugar el cultivo a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, usando tubos estériles previamente enfriados.

5.- Desechar el sobrenadante y resuspender lentamente en 1-2 mL de búffer 1 estéril frío (1.47 g de CaCl₂, 1.42 g de MgCl₂, 0.32 g de acetato de sodio, disuelto en 100 mL de agua destilada), aforar a 40 mL con búffer 1 mezclando suavemente.

6.- Centrifugar a 4,000 rpm a 4 °C por 15 minutos.

7.- Desechar sobrenadante y resuspender lentamente en 4 mL de búffer 2 estéril frío (1.47 g de CaCl₂, 15 mL de glicerol, disuelto en 100 mL de agua destilada).

8.- Hacer alícuotas de 200 µL en tubos cónicos de 1.5 mL estériles y previamente enfriados.

9.- Conservar las alícuotas a -70 °C.

10.- Realizar pruebas de control de calidad a las células quimiocompetentes: Prueba de viabilidad en medio de cultivo sin antibiótico, prueba de inhibición en medio de cultivo con antibiótico y prueba de eficacia de transformación (con 1 µL de plásmido a > 100 ng/mL debe dar una placa de agar con incontables colonias transformantes).

B. Transformación de células quimiocompetentes:

1.- Descongelar la cantidad necesaria de alícuotas de células quimiocompetentes en hielo molido (cada tubo permite realizar 2 transformaciones), nunca romper la cadena de frío ya que se puede perder la capacidad de recibir ADN plasmídico.

2.- Adicionar de 1-10 µL de ADN plasmídico (> 100 ng/mL) a 200 µL de células recién descongeladas, mezclar suavemente e incubar en hielo durante 30 minutos.

3.- Transferir a un baño metabólico a 42 °C durante 90 segundos.

4.- Transferir inmediatamente a baño de hielo durante 1-2 minutos.

5.- Adicionar 800 µL de caldo LB estéril (sin antibiótico) e incubar durante 45 minutos en baño metabólico a 37 °C ó en una incubadora, con agitación mecánica de 200 rpm.

6.- Transferir directamente 100-200 μ L de cultivo a un medio sólido LB con antibiótico ó centrifugar el cultivo a 4,000 rpm durante 10 minutos, desechar sobrenadante, adicionar 100-200 μ L de caldo LB estéril y resuspender cuidadosamente.

7.- Si se optó por la segunda opción del paso anterior: Inocular uniformemente las células bacterianas mediante el sembrado con varilla acodada en placas de agar LB con antibiótico previamente atemperadas a 37 °C, dejar secar el inóculo e incubar 18 horas a 37 °C.

*Para la transformación con el plásmido pRSET-MAP3773c se utilizaron placas de agar LB con una concentración final de 100 μ g/mL de ampicilina.

4.3.1 Identificación de bacterias transformantes por PCR:

Se seleccionaron 12 colonias transformantes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c y cada una de ellas se resembró en 5 mL de caldo LB estéril con una concentración final de 100 μ g/mL de ampicilina, se incubaron durante 14-16 horas a 37 °C con agitación mecánica de 200 rpm; se tomó un alícuota de cada cultivo para realizarle un PCR a las células bacterianas (previamente lavadas en agua estéril) para verificar que traen el plásmido con el inserto *map3773c*.

4.4 Sobreexpresión de la proteína MAP3773c en *Escherichia coli* BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c utilizando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como agente inductor.

En las pruebas de cribado se incorporó de manera adicional una cepa de *Escherichia coli* RosettaTM DE3 de Novagen Inc., la cual de igual forma se transformó con el plásmido pRSET-MAP3773c utilizando la misma metodología del punto 4.3 con la única diferencia que los medios de cultivo que en el protocolo no llevan antibiótico aquí llevan siempre una concentración final de 35 μ g/mL de cloranfenicol, y cuando en el protocolo se habla de medio de cultivo con antibiótico se utiliza una concentración final de 35 μ g/mL de cloranfenicol y 50 μ g/mL de ampicilina.

4.3.1 Pruebas de cribado de sobreexpresión

1.- Poner a cultivar una cepa transformante *Escherichia coli* BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c en 5 mL de caldo LB con una concentración final de 100 μ g/mL de ampicilina, y una cepa

transformante de *Escherichia coli* Rosetta™ DE3 – pRSET-MAP3773c en 5 mL de caldo LB con concentración final de 35 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de ampicilina, incubar ambos cultivos durante 14 - 16 a 37 °C con agitación mecánica de 200 rpm.

2.- Realizar una resiembra del cultivo del punto anterior bajo las mismas condiciones pero con un inóculo del 1 % (5 µl), incubar ambos hasta llegar a una lectura de densidad óptica entre 0.6-0.7 (final de la fase logarítmica) a 600 nm y justo ahí se induce con IPTG a una concentración final de 1 mM (se recolecta una alícuota de cultivo sin inducir, se centrifuga y descarta el sobrenadante, se congelan células).

3.- Se deja induciendo bajo las mismas condiciones de incubación por 4 - 6 horas.

4.- Se centrifugan los cultivos líquidos a 4,000 rpm durante 20 minutos, se descarta el sobrenadante y se congelan a -20 °C las células recolectadas.

5.- Se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), para observar la sobreexpresión de la proteína MAP3773c con un peso molecular de 20.6 kDa.

Se probaron las siguientes variantes para inducir la sobreexpresión de la proteína MAP3773c en 5 mL de cultivo:

Cepa transformada	Tiempo	Temperatura	Concentración final de inductor IPTG	Densidad óptica de inducción a 600 nm
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	4-6 horas	37 °C	1 mM	0.6 – 0.7
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	4 horas	37 °C	1 mM	0.4
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	5 horas	37 °C	1 mM	0.4
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	4 horas	37 °C	1 mM	0.6
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	5 horas	37 °C	1 mM	0.6
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	4 horas	37 °C	1 mM	0.8
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	5 horas	37 °C	1 mM	0.8
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	8 horas	37 °C	1 mM	0.6-0.7
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	8 horas	37 °C	0.1 mM	0.6-0.7 39

<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	8 horas	30 °C	1 mM	0.6-0.7
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	8 horas	30 °C	0.1 mM	0.6-0.7
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	16 horas	30 °C	1 mM	0.6 – 0.7
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	16 horas	15 °C	1 mM	0.6 – 0.7
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c	16 horas	15 °C	0.1 mM	0.6 – 0.7
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™ DE3 – pRSET-MAP3773c	16 horas	30 °C	1 mM	0.6 – 0.7
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™ DE3 – pRSET-MAP3773c	16 horas	30 °C	0.1 mM	0.6 – 0.7
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™ DE3 – pRSET-MAP3773c	16 horas	15 °C	1 mM	0.6 – 0.7
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™ DE3 – pRSET-MAP3773c	16 horas	15 °C	0.1 mM	0.6 – 0.7

4.3.2 Pruebas de cribado de sobreexpresión

Se seleccionaron las siguientes condiciones de inducción para la sobreexpresión de la proteína MAP3773c con la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c: 16 horas de incubación a 30 °C con una concentración final del inductor IPTG a 1 mM en el intervalo de 0.6-0.7 de densidad óptica a 600 nm; enseguida se procedió a sobreexpresar la proteína MAP3773c a partir de 10 L de caldo LB estéril. Al finalizar la inducción el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se recolectó el sobrenadante y las células recolectadas se lavaron con una solución de NaCl 0.15 M, la biomasa celular se congeló a -20 °C.

4.5 Purificación y cuantificación de la proteína MAP3773c

Se purificó la proteína recombinante MAP3773c a partir de 26.13 g de biomasa producida de *Escherichia coli* BL21 (DE3) – pRSET-MAP3773c. Se partió de la base que dejó el M.C. Jorge Aramburo Guerrero en su trabajo de tesis de maestría (Enero, 2015) donde utilizó urea (agente caotrópico) para poder purificar la proteína MAP3773c, por lo tanto se decidió utilizar el protocolo para la purificación de FurA de *Anabaena sp.* PCC 7120 mediante una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) proporcionado por el Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, España (Silvia Pellicer *et al.*, 2010):

Preparación de la columna cromatográfica de Zn-Iminodiacetato:

1. Se lavó la columna de cristal y sus mangueras con abundante agua destilada.
2. Se aplicó la cantidad de suspensión necesaria de *Matriz Chelating Sepharose™ Fast Flow* (General Electric Healthcare) para generar la matriz cromatográfica, que fue empaquetada por gravedad en la columna con un volumen de 10 mL, enseguida se lavó con 10 volúmenes de columna de agua *milli-Q* (1 volumen de columna = 10 mL) con un flujo de 3 mL/minuto para eliminar el etanol que viene de preservativo en la matriz quelante (nunca se dejó secar la columna empaquetada).
3. Se le aplicó a la columna 3 volúmenes de columna de una solución de ZnSO₄ 0.25 M previamente filtrada en papel *whatman*®, enseguida se lavó con 10 volúmenes de columna de agua *milli-Q* para eliminar el exceso de metal no adherido (todo con un flujo de 3 mL/minuto).

4. Se equilibró la columna con 10 volúmenes de columna de búffer de equilibrio previamente filtrada en papel *whatman*[®] (búffer de equilibrio = KCl 0.4 M en búffer A) (búffer A = 191.06 g/L de cloruro de guanidinio, 13.8 g/L de NaH₂PO₄, 2.42 g/L de tris-HCl ajustando el búffer a pH 8.0).

Lisis celular y purificación:

1. Se descongeló aproximadamente 13.0 g de biomasa celular en hielo molido y se homogenizó muy bien en 6 volúmenes de columna de búffer A previamente filtrado en papel *whatman*[®] y con una concentración final de 3 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, inhibidor de proteasas) que partió de una solución concentrada disuelta en isopropanol (se mantuvo siempre en un baño hielo molido la suspensión).
2. Se utilizó el equipo *Dr. Hielscher UP200s Sonifier* para sonicar la suspensión celular en hielo molido con 10 ciclos de 45 segundos con 30 segundos de pausa entre cada ciclo, con una amplitud de 90 % y ciclo de 0.5; después el lisado se centrifugó 3 veces a 20,000 rpm por 20 minutos a 4 °C, se recuperó cada vez el sobrenadante y se descartaron los restos celulares precipitados. Finalmente el lisado se pasó por filtros de 0.80 µm y 0.22 µm (*Millipore*), se tomó una alícuota de 100 µL para realizar una electroforesis SDS-PAGE.
3. El lisado filtrado se aplicó a la matriz cromatográfica con un flujo de 2 mL/minuto, y una vez recolectada se volvió a aplicar de nuevo a la columna para asegurar la mayor recuperación de la proteína recombinante, se tomó una alícuota de 100 µL del “volumen muerto” para realizar una electroforesis SDS-PAGE.
4. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de búffer de lavado 1 ((NH₄)₂SO₄ 0.5 M en búffer A, previamente filtrado en papel *whatman*[®]) con un flujo de 3 mL/minuto, se tomó una alícuota de 100 µL del volumen inicial del lavado para realizar una electroforesis SDS-PAGE.
5. La columna se lavó con la cantidad suficiente de búffer de lavado 2 (glicina 35 mM en búffer A, previamente filtrado en papel *whatman*[®]) hasta que la absorbancia del volumen eluido sea menor a 0.1 a 280 nm, con un flujo de 3 mL/minuto, se tomó una alícuota de 100 µL del volumen final del lavado para realizar una electroforesis SDS-PAGE.

6. Se eluyó la proteína recombinante utilizando un gradiente creciente de imidazol (0 - 1 M, en búffer A y previamente filtrado en papel *whatman*[®]), con un flujo de elución de 2 mL/minuto y se dejó eluir 1 volumen de columna (descartarlo), luego se recolectaron 70 fracciones de 1 mL cada una y se apartó una alícuota de 15 µL de las fracciones 1,6,11,16,21,26,31,36,41,46,51,56,61,66 y 70 (para analizarlas en electroforesis SDS-PAGE), las eluciones se guardaron a 4 °C hasta su diálisis.
7. Se lavó la columna con 30 mL de imidazol 1 M en búffer A (previamente filtrado en papel *whatman*[®]).
8. Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de agua milli-Q.
9. Se conservó la columna pasando 10 volúmenes de etanol al 20 % en agua milli-Q, se guardó a 4 °C.

Análisis por electroforesis SDS-PAGE y diálisis:

1. A las alícuotas recolectadas durante la purificación se les precipitó las proteínas de la siguiente manera, para eliminar el cloruro de guanidinio que es incompatible con los geles de poliacrilamida: se tomaron 15 µL de cada muestra a concentrar, luego se les adicionó 85 µL de agua destilada y se mezclaron con 100 µL de ácido tricloroacético al 10%, enseguida se incubaron en hielo molido durante 20 minutos; luego se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes y luego se lavó cada precipitado con 1 mL de etanol al 95 % frío, de nuevo se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes, los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron muy bien (con la ayuda de un vórtex) en 15 µL de agua destilada.
2. Con las alícuotas concentradas en el paso anterior se procedió a realizar una electroforesis SDS-PAGE en gel al 17 %.
3. Se ubicó el intervalo de fracciones de elución donde está la proteína eluida y se pasó a verificar esas eluciones con una electroforesis SDS-PAGE en gel al 17 % (con la realización previa del paso 1).
4. Se mezclaron las eluciones donde está la proteína eluida y se procedió a dializar tomando en cuenta el punto isoeléctrico teórico (hay que alejarse de ese pH, ya que precipitará) generado por el servidor ProtParam de Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>) que

tras introducirle la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante MAP3773c nos dió un $pI = 9.23$; se probaron los siguientes buffers de diálisis que para encontrar el más estable para la proteína (donde precipite menos):

- Buffer 10 mM acetato, ácido acético (para ajustar pH), pH 4.0.
 - Buffer 10 mM acetato, ácido acético (para ajustar pH), pH 5.5.
 - Buffer 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 6.5.
 - Buffer NaH_2PO_4 50 mM, 20 mM NaCl, pH 7.5.
 - Buffer 50 mM tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl.
 - Buffer 50 mM tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, glicerol 10 %.
 - Buffer KH_2PO_4 300 mM, Na_2HPO_4 300 mM, NaCl 500 mM, glicerol 10 %, pH 6.5.
 - Buffer KH_2PO_4 180 mM, Na_2HPO_4 580 mM, NaCl 500 mM, glicerol 10 %, pH 7.0.
 - Buffer KH_2PO_4 35 mM, Na_2HPO_4 115 mM, NaCl 500 mM, glicerol 10 %, pH 7.0.
 - Buffer KH_2PO_4 70 mM, Na_2HPO_4 790 mM, NaCl 500 mM, glicerol 10 %, pH 7.5.
5. Para efectuar las diálisis se emplearon membranas de diálisis con tamaño de exclusión de 10 kDa, que se sumergieron en un vaso de precipitados con un volumen del buffer de diálisis al menos 100 veces superior al de la muestra a dializar (con agitación magnética), las diálisis se realizaron siempre a 4°C, cambiando el buffer del vaso 3 veces cada 3 horas, haciendo un último cambio de buffer a las 12 horas y finalizando la diálisis 6 horas después.

4.6 Caracterización bioquímica de la proteína MAP3773c

4.6.1 Espectroscopia de absorción molecular Ultravioleta-Visible

Se realizó un espectro de absorción de la proteína MAP3773c desde 250 a 700 nm con un espectrofotómetro UV-Visible *Specord® 250 Plus* (Analytikjena, An Endress+Hauser Company).

4.6.2 Análisis de entrecruzamiento con glutaraldehído

Se incubó 50 μ M de proteína MAP3773c con 0.5 % de glutaraldehído en un volumen final de 10 μ L, la mezcla se incubó 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente (sin agitación), finalmente la reacción se mezcló con 2 μ L de búffer de carga 6X y se cargó en una electroforesis SDS-PAGE para su análisis.

4.6.3 Análisis de oligomerización con ditiotreitól (DDT)

Se incubó 50 μ M de proteína MAP3773c con 10 y 20 mM de DTT durante 30 minutos a temperatura ambiente (sin agitación), al final se incubaron las reacciones en búffer de carga concentración final 1X en presencia (condición reductora) y ausencia de beta-mercaptoetanol (condición no reductora) para su análisis en una electroforesis SDS-PAGE.

4.6.4 Análisis de dimerización con Zn^{++} y Mn^{++}

Se analizó la dimerización de la proteína MAP3773c al colocar 10 μ M de ella en presencia de $ZnSO_4$ y de $MnCl_2$ a una concentración final de 10 mM para cada ión, se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (sin agitación), para su análisis se mezclaron las reacciones con búffer de carga a una concentración final de 1 X y en condiciones no reductoras (ausencia de beta-mercaptoetanol), finalmente se cargaron en una electroforesis SDS-PAGE.

4.6.5 Tinción PAR para la detección de Zn^{++}

Para analizar la presencia de zinc estructural en la proteína MAP3773c primero se realizó una electroforesis SDS-PAGE y el gel fue teñido con 50 mL del búffer de tinción que contiene lo siguiente: 20 mM tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 % v/v glicerol y 500 μ M del colorante 4-(2-Piridilazo)-resorcinol (PAR), se mezcló con agitación suave por 2 minutos y

luego se añadió 500 µL de H₂O₂ al 30 % por la orilla del recipiente donde se llevó a cabo la tinción (no directamente al gel), el colorante PAR reacciona con los iones de zinc para formar un complejo de color naranja que se puede observar a simple vista que desaparece tras 5 - 10 minutos.

4.6.5 Dicroísmo circular

4.6.6 Reactividad cruzada: Western Blot con anticuerpos policlonales

Se probó la unión a la proteína MAP3773c con anticuerpos policlonales anti-FurA y anti-FurB de *Anabaena* sp. PCC 7120, así también con anti-FurB de *Escherichia coli*, mediante la técnica de Western Blot; esto para buscar una reactividad cruzada por determinantes antigénicos que nos indica cierto grado de homología entre las proteínas.

El Western Blot se realizó con el protocolo proporcionado por el Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, España, manipulando todo con guantes y pinzas para evitar contaminación con proteínas:

- 1.- Se realizaron 2 electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) con la proteína MAP3773c, cargando lo mismo en ambos geles (“gemelos”). Se tiñó 1 gel con la tinción azul de Coomassie y el otro no (se usó para la electrotransferencia).
- 2.- Se cortó una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Millipore) y 2 papeles filtro del mismo tamaño del gel que se usará para electrotransferir (no teñido).
- 3.- La membrana de PVDF se ambientó de la siguiente manera: se sumergió durante 10 segundos en metanol, luego 2 minutos en agua destilada y por último 2 minutos en búffer de transferencia (48 mM tris-HCl pH 9.2, 39 mM glicina, 1.6 mM dodecil sulfato de sodio, 20 % metanol).
- 4.- Los papeles filtro se remojaron en búffer de transferencia durante 15 segundos.
- 5.- Se hizo un sándwich en el siguiente orden retirando cada vez el exceso de líquido y evitando burbujas: abajo = papel filtro – membrana de PVDF – gel con proteínas – papel filtro = arriba.
- 6.- Las proteínas se transfirieron del gel a la membrana de PVDF en una cámara de electrotransferencia semiseca *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) aplicando un voltaje de 15 Volts durante 60 minutos utilizando una fuente de corriente *PowerPac 300* (Bio-Rad).

- 7.- Se retiró la membrana de PVDF de la cámara de transferencia y se lavó 2 veces con búffer TBS (50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) para eliminar el búffer de transferencia.
- 8.- La membrana se bloqueó con búffer TBS + 5 % de leche descremada en polvo, durante 1 hora a temperatura ambiente ó toda la noche a 4 °C, y con agitación suave.
- 9.- Se lavó la membrana bloqueada 3 veces durante 5 minutos con búffer TBS + 0.5 % de leche descremada en polvo.
- 10.- La membrana se cortó en 3 y cada parte se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación suave con los siguientes anticuerpos diluidos en búffer TBS + 0.5 % de leche descremada en polvo: Anti-FurA de *Anabaena sp.* PCC 7120 1:200 (125 µL/25 mL), Anti-FurB de *Anabaena sp.* PCC 7120 1:1000 (25 µL/25 mL) y Anti-Fur de *Escherichia coli* 1:1000 (25 µL/25 mL).
- 11.- La membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos con búffer TBS + 0.1 % v/v de tween 20.
- 12.- Enseguida los 3 segmentos de membrana se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación suave con anti-IgG conjugada con peroxidasa diluida 1:3000 en búffer TBS + 0.5 % de leche descremada en polvo (10 µL/30 mL).
- 13.- Se lavó 3 veces durante 10 minutos con búffer TBS + 0.1 % v/v de tween 20.
- 14.- Lavó 2 veces durante 5 minutos con búffer fosfocitrato (24.3 mM ácido cítrico, 5.14 mM Na₂HPO₄, pH 5.3).
- 15.- Se preparó al momento la solución de revelado cromogénico: se disolvió 20 mg de TMB (3, 3', 5, 5' tetrametil-bencidina) y 80 mg de dioctil sulfosuccinato (DONS) en 10 mL de etanol absoluto a 60 °C, luego se mezcló con 30 mL de búffer fosfocitrato y por último se le agrego 15 µL de H₂O₂ al 30 %.
- 16.- La membrana se sumergió en la solución de revelado cromogénico en obscuridad y al observarse aparición de bandas de color azul se detuvo la reacción con agua destilada.

4.7 Caracterización funcional de la proteína MAP3773c

4.6.6 Ensayos de retardamiento en gel (EMSA)

4.6.7 Calorimetría de Titulación Isotérmica

Lisis celular y purificación:

1. Se descongeló aproximadamente 13.0 g de biomasa celular en hielo molido y se homogenizó muy bien en 6 volúmenes de columna de búffer A previamente filtrado en papel *whatman*[®] y con una concentración final de 3 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, inhibidor de proteasas) que partió de una solución concentrada disuelta en isopropanol (se mantuvo siempre en un baño hielo molido la suspensión).
2. Se utilizó el equipo *Dr. Hielscher UP200s Sonifier* para sonicar la suspensión celular en hielo molido con 10 ciclos de 45 segundos con 30 segundos de pausa entre cada ciclo, con una amplitud de 90 % y ciclo de 0.5; después el lisado se centrifugó 3 veces a 20,000 rpm por 20 minutos a 4 °C, se recuperó cada vez el sobrenadante y se descartaron los restos celulares precipitados. Finalmente el lisado se pasó por filtros de 0.80 µm y 0.22 µm (*Millipore*), se tomó una alícuota de 100 µL para realizar una electroforesis SDS-PAGE.
3. El lisado filtrado se aplicó a la matriz cromatográfica con un flujo de 2 mL/minuto, y una vez recolectada se volvió a aplicar de nuevo a la columna para asegurar la mayor recuperación de la proteína recombinante, se tomó una alícuota de 100 µL del “volumen muerto” para realizar una electroforesis SDS-PAGE.
4. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de búffer de lavado 1 ((NH₄)₂SO₄ 0.5 M en búffer A, previamente filtrado en papel *whatman*[®]) con un flujo de 3 mL/minuto, se tomó una alícuota de 100 µL del volumen inicial del lavado para realizar una electroforesis SDS-PAGE.
5. La columna se lavó con la cantidad suficiente de búffer de lavado 2 (glicina 35 mM en búffer A, previamente filtrado en papel *whatman*[®]) hasta que la absorbancia del volumen

eluido sea menor a 0.1 a 280 nm, con un flujo de 3 mL/minuto, se tomó una alícuota de 100 μ L del volumen final del lavado para realizar una electroforesis SDS-PAGE.

VI. RESULTADOS

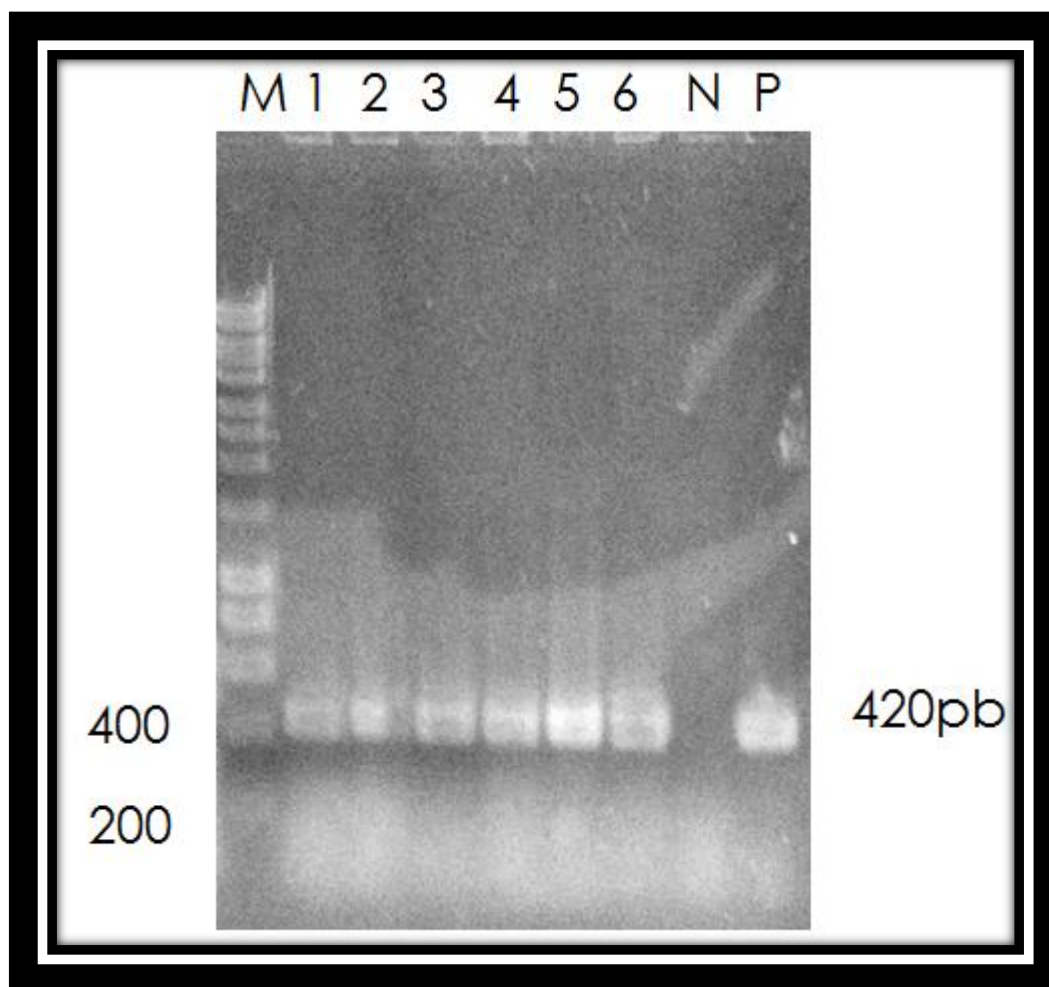


Figura 11. Construcción de TOPO- MAP3773c. Verificación del tamaño correcto (420pb) de inserto MAP3773c de 6 clonas del constructo TOPO-MAP3773c. Carriles del 1 al 6 clonas de

TOPO- MAP3773c , M, marcador de peso molecular, N, control negativo y P, control positivo de ADN de MAP ATCC19698.

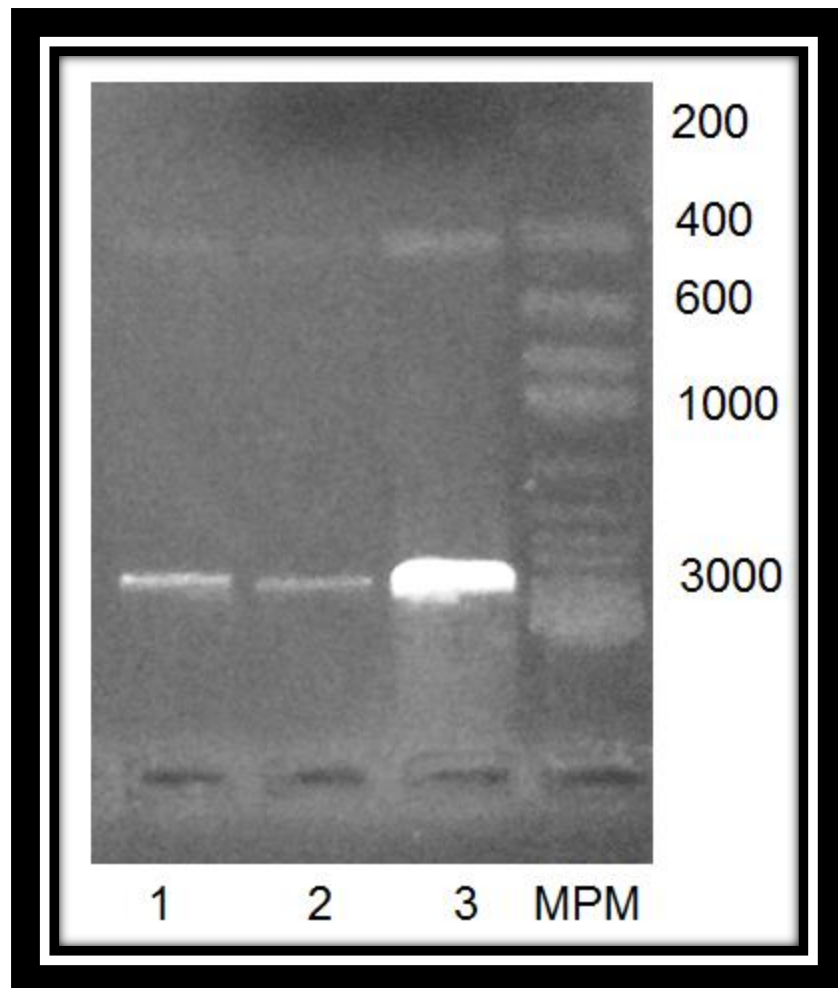


Figura 12. Plásmido TOPO- MAP3773c digerido con enzimas *SacI* y *HindIII*, se muestra el fragmento de 420 pb, en los carriles 1,2 y 3 MPM, marcador de peso molecular.

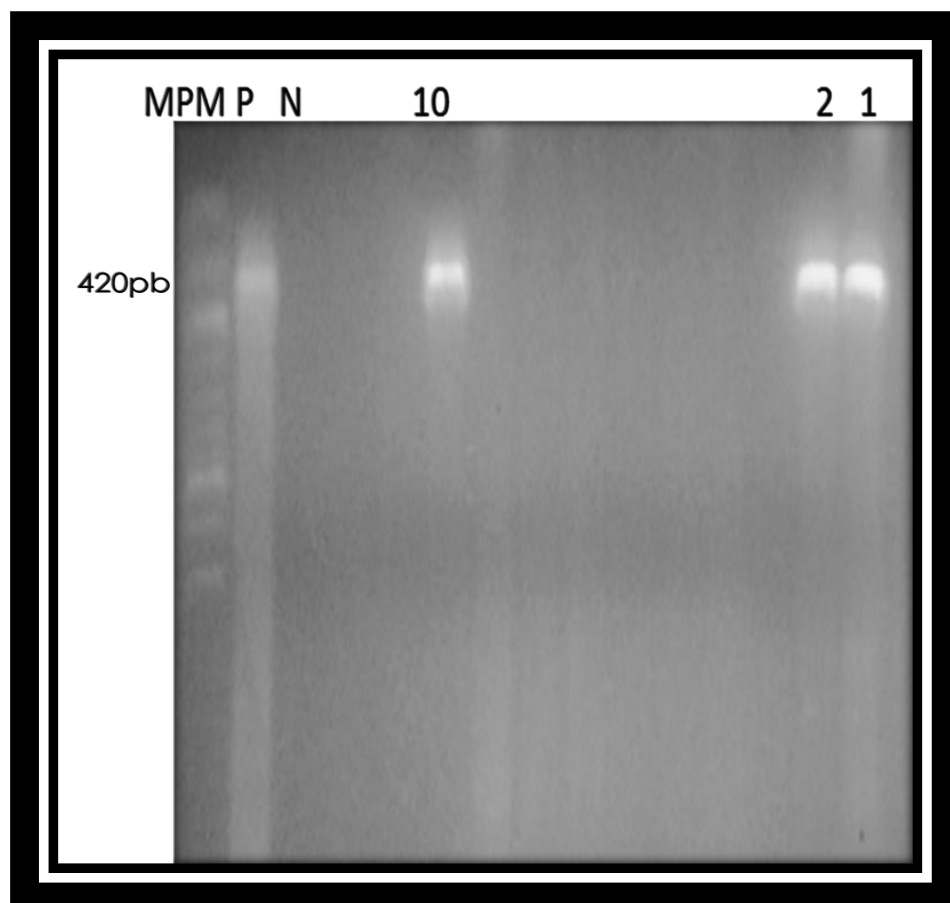


Figura 13. Clonas 1, 2 y 10 positivas a MAP3773c. Las clonas positivas a MAP3773c fueron las clonas 1, 2, y 10, en gel de agarosa al 1.5%. Se utilizó MPM de 100 pb.

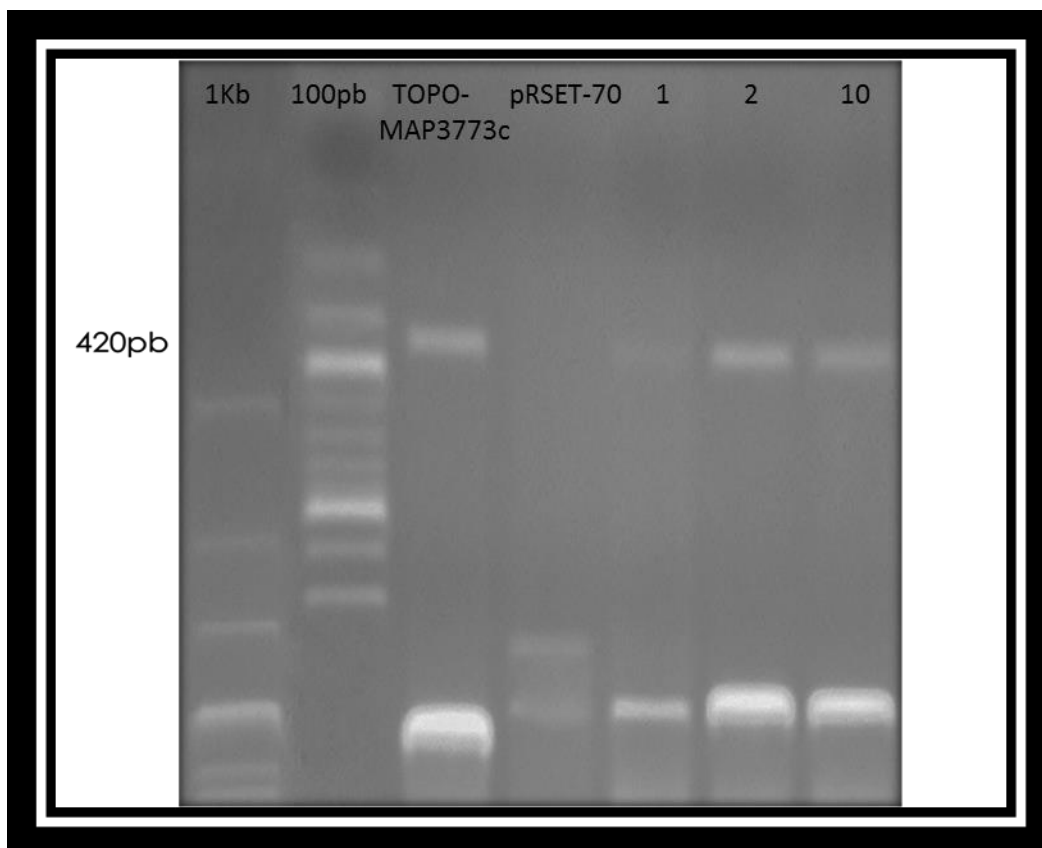


Figura 14. Digestión de pRSET - MAP3773c con enzimas *Sac I* y *HindIII* de las clonas 1, 2, y 10. Se utilizó MPM de 1Kb y otro de 100 pb, y como controles TOPO- MAP3773c, y pRSET - 70. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%.

Expresión de la proteína MAP3773c

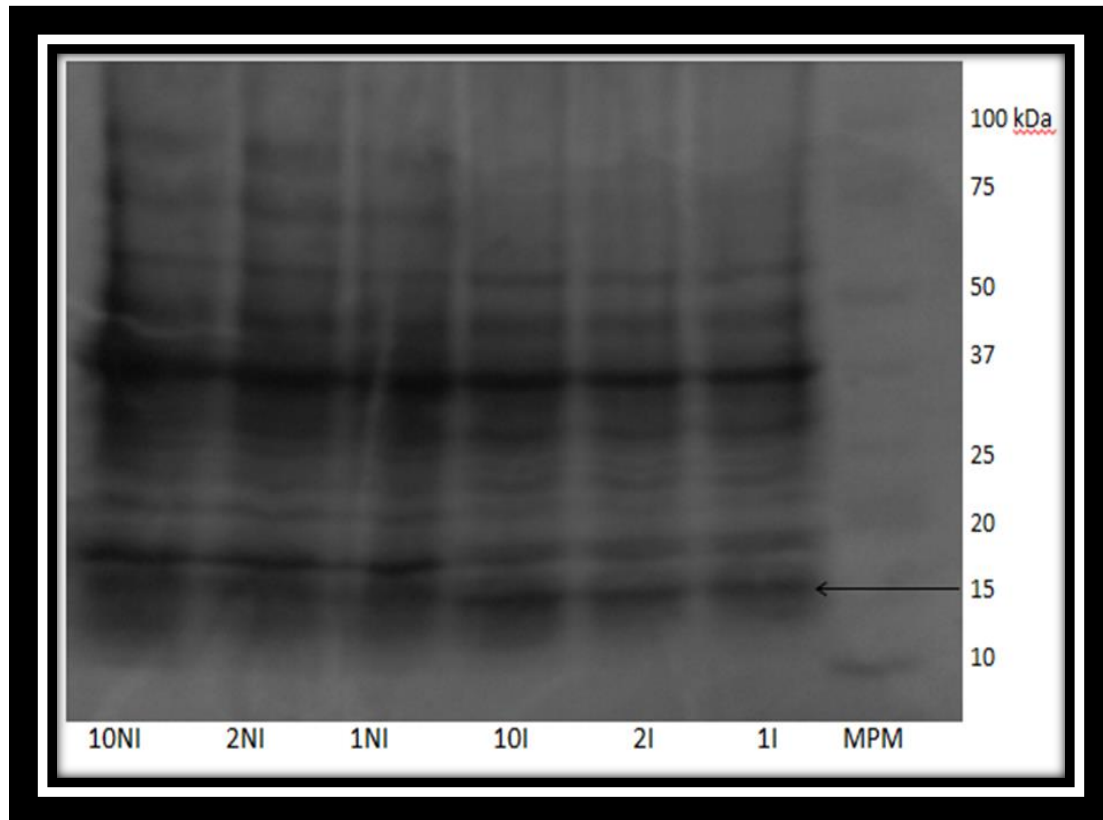


Figura 15. Expresión de la proteína MAP3773c en BL21 (DE3) en la clona 10. Gel hecho en gradiente en 4%, 8% y 12%.

NI: No inducida

I: Inducida

MPM: Marcador de peso molecular

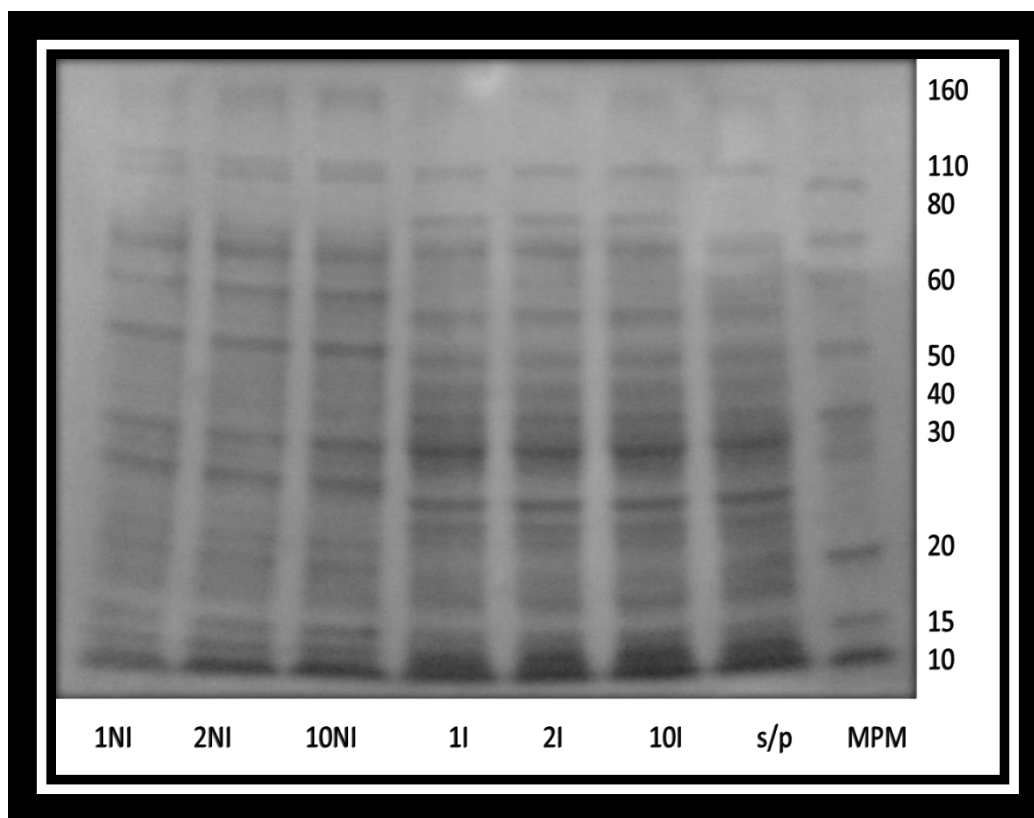


Figura 16. Expresión de la proteína MAP3773c en la cepa BL21 (DE3) utilizando la clona 10. En este gel no se observa con claridad la proteína. El gel en donde se corrió fue un gel de una concentración de 7% de la compañía BIORAD.

NI: No inducida

I: Inducida

s/p: Sin plásmido

MPM: Marcador de peso molecular

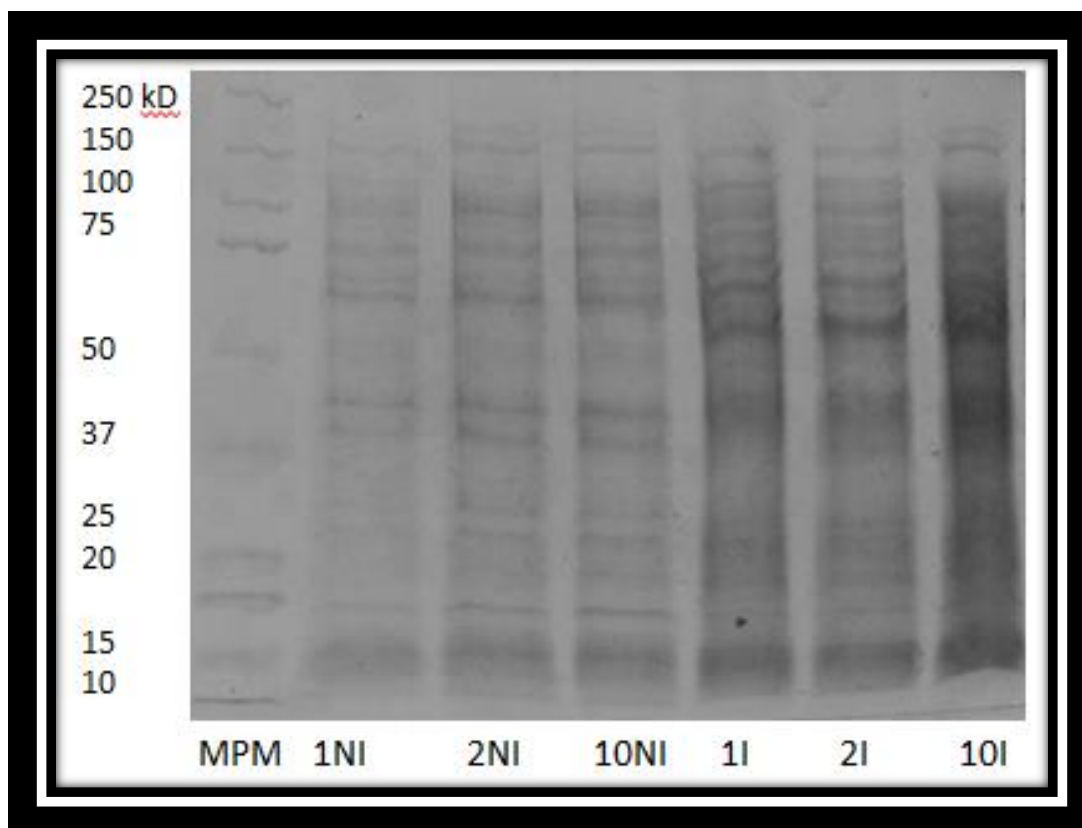


Figura 17. Clonas 1, 2 y 10 en BL21 (DE3) pLysS. En este caso no se observó la presencia de la proteína en BL21 (DE3) pLysS. Se utilizó gel en gradiente al 4%, 8% y 12%.

NI: No inducida

I: Inducida

MPM: Marcador de peso molecular

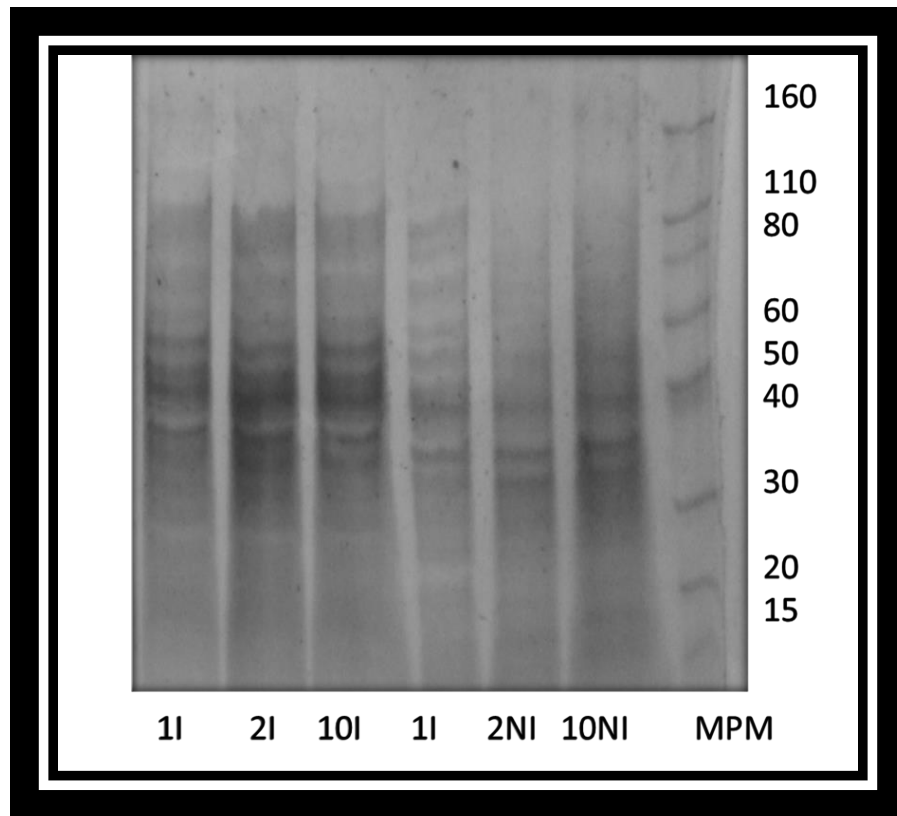


Figura 18. Clonas 1, 2 y 10 en la cepa BL21. No se observó la presencia de la proteína en las clonas 1,2 y 10 en la cepa BL21. Se utilizó gel en gradiente al 4%, 8% y 12%.

NI: No inducida

I: Inducida

MPM: Marcador de peso molecular

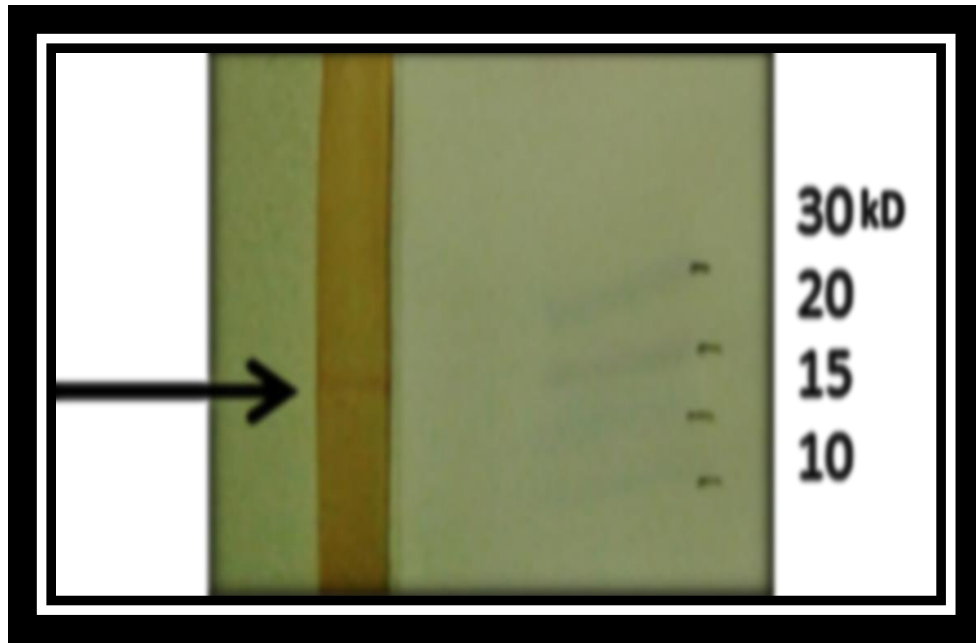


Figura 19. Verificación de la expresión del pRSETA-MAP3773c -6His en E-coli mediante anticuerpo anti-his. Se observa una banda de aproximadamente 18 kDa en la membrana transferida con la cepa BL21 (DE3) utilizando la clona 10.

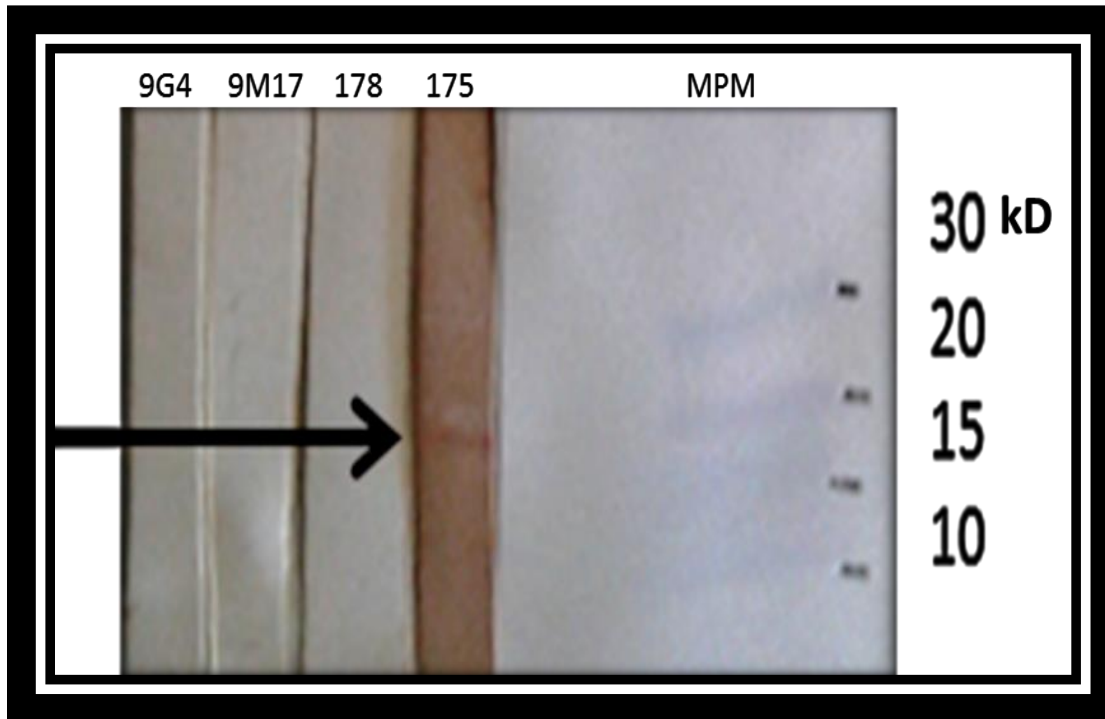


Figura 20. Seroreactividad de MAP3773c recombinante con sueros de borregos infectados con MAP. Se observa que el suero no. 175 fue reactivo mientras que los sueros 9G4, 9M17 Y 178, resultaron no reactivos al ensayo de Western blotting.

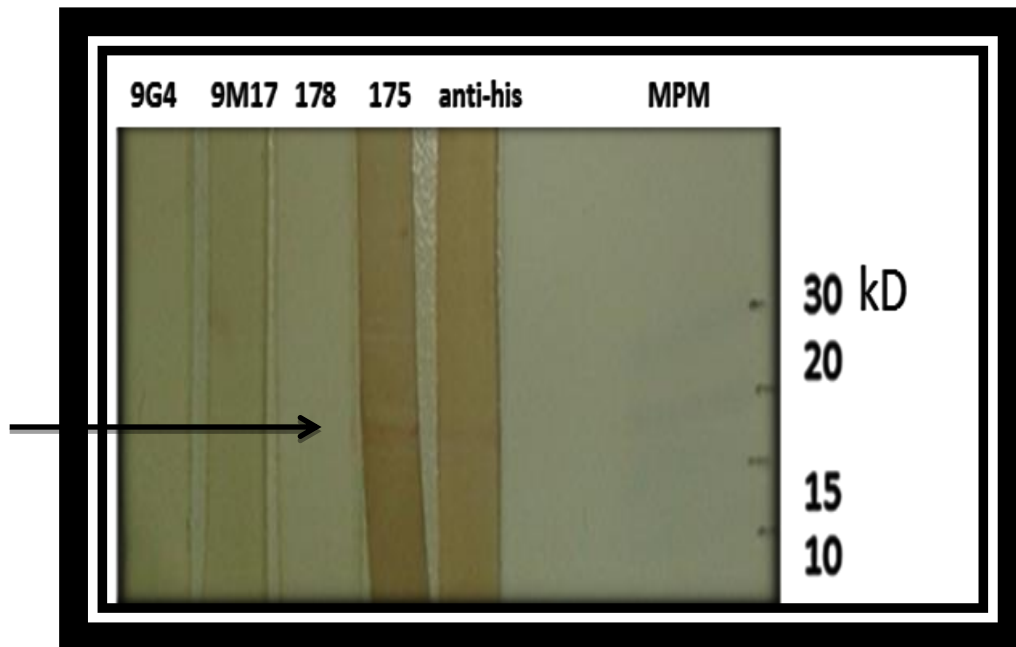


Figura 21. Presencia de la proteína con el anticuerpo anti-his tag y seroreactividad con los sueros de borrego. Los sueros de ovino 9G4, 9M17, 178 resultaron no reactivas al contrario del suero 175 resultando reactivo.

Conejo

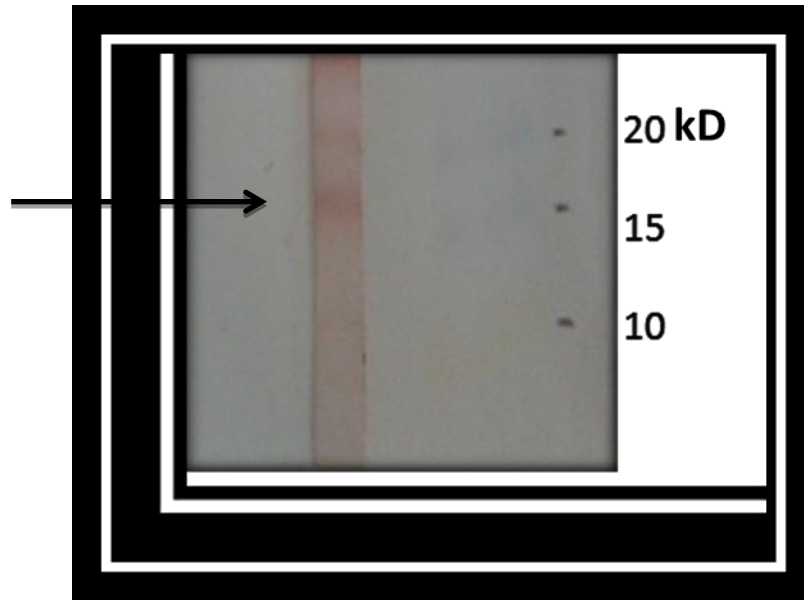


Figura 22. Inmunogenicidad con suero de conejo inmunizado con extractos completos de E.coli BL21(DE3). Se observa una banda de aproximadamente 15 kDa.

Ratón

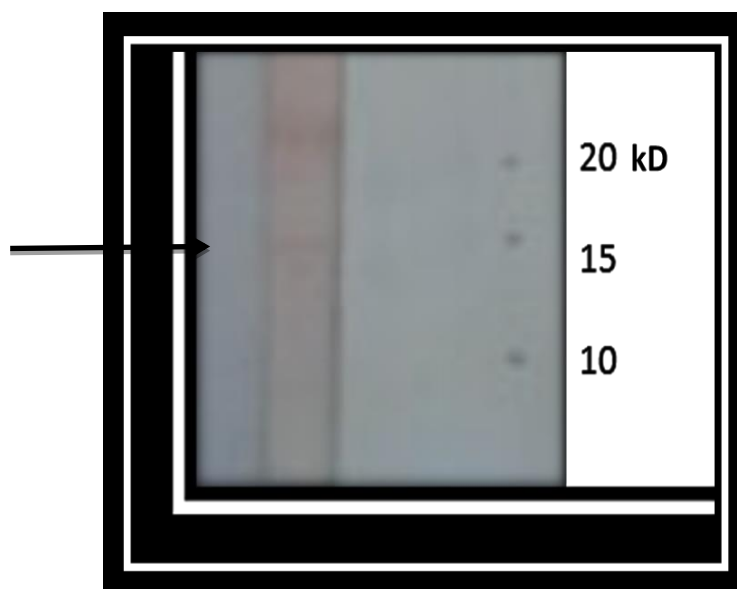


Figura 23. Inmunogenicidad con suero de ratón BALB/c, observándose una banda tenue de aproximadamente 15 kDa.

De acuerdo a los resultados presentados en este estudio, se logró clonar MAP3773c en el plásmido TOPO pCR 2.1 para posteriormente clonarlo en el vector de expresión pRSET en *E. Coli* TOP10F DH5 α y expresarlo en la cepa BL21 (DE3) de *E.coli* inducido con IPTG, ya que fue la cepa donde se obtuvo la expresión de la proteína recombinante MAP3773c. En las cepas BL21 (DE3)plysS y BL21, si se obtuvieron clones en el experimento de transformación que fueron positivas a MAP3773c comprobándose con PCR y por digestión con las enzimas *SacI* y *HindIII*, así como también utilizando los controles de TOPO-MAP3773c y pRSET-70, sin embargo en experimentos posteriores no se observó la expresión en SDS-PAGE, así como tampoco se observó en los ensayos con Western blotting. Se intentó expresar la proteína recombinante MAP3773c en estas dos cepas BL21(DE3)plysS y BL21 porque la posibilidad de que expresaran proteínas no inducidas potencialmente tóxicas es muy baja. Sin embargo una de las posibles explicaciones a esto es que en las cepas BL21(DE3)plysS y BL21 el nivel de expresión no es tan alta como en la cepa BL21 (DE3). Así mismo para demostrar la presencia de

la proteína recombinante de MAP3773c se utilizó el anticuerpo anti-his tag como se muestra en la figura 19. Se realizó seroreactividad con sueros de ovinos enfermos y sueros de conejo y ratón de la cepa BALB/c inmunizados con extractos completos de las bacterias recombinantes. De los 4 sueros de ovinos enfermos 1 resulto seroreactivo siendo el suero no. 175 y 3 no seroreactivos que fueron los sueros 9G4, 9M17 y 178, como indica la figura 20. En la figura 21, se observa la misma posición de la banda seroreactiva de la tira del suero 175 y la tira con el anticuerpo anti-his tag. También se realizó la inmunogenicidad con suero de conejo observándose una banda de aproximadamente 15 kDa al igual que en el suero de ratón BALB/c, sin embargo la banda del suero de conejo se observa más gruesa aunque un poco difusa. La inmunogenicidad con el suero de ratón BALB/c se ve delgada y tenue y no al mismo peso molecular como se observa con el anticuerpo anti his tag. Cabe mencionar que la proteína recombinante aún no se encuentra purificada por lo que se utilizó en los experimentos sin purificar, es decir, únicamente con las células completas lisadas, es debido a eso que en los ensayos de Western blotting en sueros especialmente de conejo y ratón se observan varias bandas sin interés para la investigación.

VII. DISCUSIONES

Entre las mayores necesidades para la lucha eficaz contra la paratuberculosis son nuevas herramientas de diagnóstico que identifiquen con mayor precisión a los animales infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Desafortunadamente, el diagnóstico de la enfermedad de Johne se ha visto obstaculizado por la falta de ensayos sensibles y específicos, así como una falta de antígenos que lo distinguen de otras micobacterias estrechamente relacionados, incluyendo *M. avium* subsp. *avium*.^[1] La presencia del gen *fur* ha sido identificada por reacción de PCR en diferentes especies de micobacterias, incluyendo: *Mycobacterium simiae*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. terrae*, *M. smegmatis*, *M. abscessus*, and *M. avium*^[63]. Fur, que está principalmente involucrado en la regulación del metabolismo del hierro, ahora se sabe que regula un gran número de genes^[61]. La relación entre Fur y la patogenia está sin duda relacionada con la limitación de hierro que sufren estos microbios en diferentes hábitats. Aunque a pesar de extensos estudios sobre las funciones de Fur en diferentes organismos, el cuadro de este es aún incompleto^[59]. En este estudio se muestra el alineamiento de la proteína MAP3773c de MAP en la figura 9 con la misma proteína pero con otras especies de bacterias, donde el sombreado amarillo indica los sitios de unión de Fur. La proteína identificada en este estudio MAP3773c muestra un alto nivel de identidad con otras proteínas Fur conocidos^[62] de otras especies bacterianas que han sido reportados en diferentes estudios. El importante papel de Fur como proteína fue descrito por primera vez en *E. coli*. Se han encontrado más de 90 genes de diversas cepas de *E. coli* que se rige por la proteína Fur y por hierro^[64]. Una vez que la proteína Fur está unida a su ADN diana, se bloquea el acceso de la ARN polimerasa, reprimiendo de ese modo los genes río abajo. Se ha demostrado que Fur controla dos pequeños RNAs reguladores (*rhyA* y *rhyB*), que a su vez regulan la expresión de otros genes implicados en el metabolismo del hierro^[63, 65]. Ha habido muchos informes de experimentos en los que las mutaciones en algunos genes de transporte de hierro dependientes de Fur impidieron la invasión sucesiva por el patógeno. Aunque el papel de Fur en la patogénesis es aun objeto de estudio^[63, 66], incluso en esta etapa es claro que Fur puede ser un blanco prometedor para el diseño de fármacos^[66]. En este trabajo se utilizó MAP3773c que es la nomenclatura porque aún no se descubre si la proteína tiene la misma función que la proteína Fur. Por lo mencionado anteriormente hace necesario el desarrollo de más estudios incorporando

técnicas adicionales para lograr un mejor conocimiento del papel que juega la proteína MAP3773c particularmente en *MAP*.

VIII. CONCLUSIONES

Se obtuvo la expresión de la proteína recombinante MAP3773c en la cepa BL21 (DE3) en *E.coli*. A partir de este estudio, se puede crear un panorama más amplio en el estudio de vacunas contra *MAP*. Se sabe que MAP3773c de *MAP* es una proteína hipotética, por lo que se necesita mayor análisis de estudio para demostrar su función, una vez descubierta su función sería un blanco importante para la elaboración de vacunas contra la paratuberculosis. La paratuberculosis es una enfermedad crónica que infecta a rumiantes y está relacionada con la enfermedad de Crohn en humanos. La importancia de desarrollar nuevas técnicas para el diagnóstico oportuno y específico contra *MAP* resulta de gran relevancia, sin embargo, hoy en día el diagnóstico para, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, aún carece de sensibilidad debido a la falta de antígenos disponibles. Gracias a esta problemática la comunidad científica se ha visto impulsada a realizar numerosas investigaciones para combatir la enfermedad de la paratuberculosis. Esto ayudaría a evitar su propagación, incluso también evitaría pérdidas económicas en ganados y al mismo tiempo mejoraría indudablemente el impacto ambiental.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. John P. Bannantine. Expression and Immunogenicity of Proteins Encoded by Sequences Specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2004, p. 106–114
2. Stabel, J. R. 1998. Johne's disease: a hidden threat. J. Dairy Sci. 81:283–288.
3. Antonio M. Scanu. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Infection in Cases of Irritable Bowel Syndrome and Comparison with Crohn's Disease and Johne's Disease: Common Neural and Immune Pathogenicities., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 2007, p. 3883–3890
4. Marcel A. Behr and Desmond M. Collins. Paratuberculosis Organism, Disease, Control.
5. Michael L Paustian. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species.
6. Miguel Fernández, Julio Benavides, Iker A Sevilla, Miguel Fuertes, Pablo Castaño, Laetitia Delgado, J Francisco García Marín, Joseba M Garrido, M Carmen Ferreras and Valentín Pérez. Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings.
7. Antonio M. Scanu, Tim J. Bull, Sara Cannas, Jeremy D. Sanderson, Leonardo A. Sechi, Giuseppe Dettori, Stefania Zanetti, and John Hermon-Taylor. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Infection in Cases of Irritable Bowel Syndrome and Comparison with Crohn's Disease and Johne's Disease: Common Neural and Immune Pathogenicities. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 2007, p. 3883–3890
8. Casey L Cazer, Rebecca M Mitchell, Kellie M Cicconi-Hogan, Michael Gamroth, Roxann M Richert, Pamela L Ruegg and Ynte H Schukken. Associations between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibodies in bulk tank milk, season of sampling and protocols for managing infected cows. BMC Veterinary Research 2013, 9:234
9. BEARD P.M., HENDERSON D., DANIELS M.J., PIRIE A., BUXTON D., GREIG A., HUTCHINGS M.R., MCKENDRICK I., RHIND S., STEVENSON K. & SHARP J.M. (1999). Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). Vet. Rec., 145, 612–613.
10. Stratmann, Birgit Strommenger, Ralph Goethe, Karen Dohmann, Gerald-F. Gerlach, Karen Stevenson, Ling-ling Li, Qing Zhang, Vivek Kapur, and Tim J. Bull. A 38-Kilobase Pathogenicity Island Specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Encodes Cell Surface Proteins Expressed in the Host. JOURNAL OF INFECTION AND IMMUNITY, Mar. 2004, p. 1265–1274
11. Gesgam Magomedze, Calistus N. Ngonghala, Cristina Lanzas. Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne's Disease through Mathematical Modelling.

12. Stabel J. Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Animal Health Research Reviews* 7: 61–70 (2007)
13. USDA (2011) Johne's disease dairy. National Johne's Education Initiative 2 (3).
14. Lingling Li et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PNAS* August 30, 2005 vol. 102 no. 35
15. D. J. WEISS AND C. D. SOUZA. Modulation of Mononuclear Phagocyte Function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 45:829–841 (2008)
16. Cossu et al. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and SLC11A1 polymorphisms in Sardinian multiple sclerosis patients. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(3):203-207
17. John P. Bannantine et al. Genome Scale Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Reveals Potential Diagnostic Sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40(4):1303.
18. Judith T. Murphy et al. Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol Genomics* 28: 67–75, 2006.
19. Naiara Abendaño. Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Responses to Infection: A Common Denominator of Human and Bovine Macrophages. Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Volume 2013, Article ID 908348.
20. E.J.B. Manning & M.T. Collins *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2001, 20 (1), 133-150
21. Tania Di Pietrantonio, Carmen Hernandez, Manon Girard, Annie Verville, Marianna Orlova, Adam Belley, Marcel A. Behr, J. Concepcion Loredó-Osti, Erwin Schurr Strain-Specific Differences in the Genetic Control of Two Closely Related *Mycobacteria*. October 2010, Volume 6
22. Davide Cossu, Speranza Masala, Eleonora Cocco, Daniela Paccagnini, Stefania Tranquilli, Jessica Frau, Maria Giovanna Marrosu, Leonardo Antonio Sechi. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and SLC11A1 polymorphisms in Sardinian multiple sclerosis patients. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(3):203-207.
23. John P. Bannantine, a Lingling Li, Michael Mwangi, Rebecca Cote, Juan A. Raygoza Garay, Vivek Kapurb. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Isolated from Human Breast Milk. January/February 2014 Volume 2 Issue 1
24. System for Use with Recombinant *Mycobacteria*. *INFECTION AND IMMUNITY*. Aug. 1998, p. 3643–3648
25. Phillip Trefz, Heike Koehler, Klaus Klepik, Petra Moebius, Petra Reinhold, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch. Volatile Emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Mirror Bacterial Growth and Enable. Distinction of Different Strains. October 2013 | Volume 8 | Issue 10.

26. D. J. WEISS, O. A. EVANS, M. DENG, AND M. S. ABRAHAMSEN Gene Expression and Antimicrobial Activity of Bovine Macrophages in Response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet Pathol 41:326–337 (2004)
27. D. J. WEISS AND C. D. SOUZA. REVIEW PAPER: Modulation of Mononuclear Phagocyte Function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet Pathol 45:829–841 (2008).
28. Maria Laura Mon, Mariana Viale, Guido Baschetti, Fiorella Alvarado Pinedo, Andrea Gioffre, Gabriel Traveria, Peter Willemsen, Douwe Bakker, and Maria Isabel Romano. Search for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. Veterinary Medicine International. Volume 2012, Article ID 860362.
29. Janagama et al. Iron-sparing Response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. BMC Microbiology 2010, 10:268
30. Sharmistha Banerjee, Aisha Farhana, Nasreen Z. Ehtesham, Seyed E. Hasnain. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria. Infection, Genetics and Evolution 11(2011)825–838.
31. Erin E. Johnson a, Marianne Wessling-Resnick. Iron metabolism and the innate immune response to infection. Microbes and Infection 14 (2012).
32. Kristopher E. Van Zandt, Fatoumata B. Sow. The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. Journal of Leukocyte Biology. Volume 84, September 2008.
33. J.M. Blackwell, T. Goswami, C.A. Evans, D. Sibthorpe, N. Papo, J.K. White, S. Searle, E.N. Miller, C.S. Peacock, H. Mohammed, M. Ibrahim. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance, Cell Microbiol. 3 (2001) 773e784.
34. M.F. Cellier, P. Courville, C. Champion, Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense, Microb. Infect. 9 (2007) 1662e1670.
35. Fikret Aydemir, Supak Jenkitkasemwong, Sukru Gulec, and Mitchell D. Knutson Iron Loading Increases Ferroportin Heterogeneous. Nuclear RNA and mRNA Levels in Murine J774 Macrophages. 2009 American Society for Nutrition.
36. PAUL PICCINELLI and TORE SAMUELSSON. Evolution of the iron-responsive element. RNA (2007), 13:952–966.
37. Tomas Ganz. Cellular iron: Ferroportin is the only way out. CELL METABOLISM, MARCH 2005
38. D. Pérez Surribas. Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. Química Clínica 2005; 24 (1) 5-40
39. Michael J Cipriano1, Pavel N Novichkov, Alexey E Kazakov, Dmitry A Rodionov, Adam P Arkin, Mikhail S Gelfand, and Inna Dubchak. RegTransBase – a database of regulatory sequences and interactions based on literature: a resource for investigating transcriptional regulation in prokaryotes. BMC Genomics 2013, 14:213

40. Bryan Troxell and Hosni M. Hassan. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 02 October 2013.
41. Yalbi Itzel Balderas-Martinez, Michael Savageau, Heladia Salgado, Ernesto Perez-Rueda, Enrique Morett, Julio Collado-Vides. Transcription Factors in *Escherichia coli* Prefer the Holo Conformation. *PLoS ONE* 8(6): e65723. doi:10.1371/journal.pone.0065723
42. Steven Hahn and Elton T. Young. Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. *Genetics*, Vol. 189, 705–736 November 2011
43. Dev Bhatt and Sankar Ghosh. Regulation of the NF- κ B-mediated transcription of inflammatory genes. *Frontiers in Immunology*. February 2014 | Volume 5 | Article 71.
44. Beth M. Carpenter, Jeannette M. Whitmire, and D. Scott Merrell. This Is Not Your Mother's Repressor: the Complex Role of Fur in Pathogenesis. *INFECTION AND IMMUNITY*, July 2009, p. 2590–2601 Vol. 77, No. 7
45. LUCIA ESCOLAR, JOSE PEREZ-MARTIN, AND VICTOR DE LORENZO. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. Oct. 1999, p. 6223–6229 Vol. 181, No. 20
46. Anuradha Alahari, Anil Kumar Tripathi, Daniel Le Rudulier. Cloning and Characterization of a fur Homologue from *Azospirillum brasilense* Sp7 *CURRENT MICROBIOLOGY* Vol. 52 (2006), pp. 123–127
47. Klaus Hantke. Members of the Fur Protein Family Regulate Iron and Zinc Transport in *E. coli* and Characteristics of the Fur-Regulated FhuF Protein. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (2002) 4(3): 217–222.
48. Zehua Chen, Karen A. Lewis, Ryan K. Shultzaberger, Ilya G. Lyakhov, Ming Zheng, Bernard Doan, Gisela Storz and Thomas D. Schneider. Discovery of Fur binding site clusters in *Escherichia coli* by information theory model. *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 20
49. Ludovic Pecqueur, Benoît D'Autréaux, Jérôme Dupuy, Yvain Nicolet. Structural changes of *E. coli* Fur during metal dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* May 11, 2006 .
50. Renata Grifantini, Shite Sebastian, Elisabetta Frigimelica, Monia Draghi, Erika Bartolini, Alessandro Muzzi, Rino Rappuoli, Guido Grandi and Caroline Attardo Genco. Identification of iron-activated and repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. 9542–9547, *PNAS*, August 5, 2003 vol. 100, no. 16
51. Xin-Wei Yang, Ying He, Jun Xu, Xiang Xiao, Feng-Ping Wang. The Regulatory Role of Ferric Uptake Regulator (Fur) during Anaerobic Respiration of *Shewanella piezotolerans* WP3. *PLOS ONE*. October 2013 | Volume 8 | Issue 10 | e75588

52. C. Daniela Rinaudo, John L. Telford, Rino Rappuoli, and Kate L. Seib. Vaccinology in the genome era. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 119 Number 9 September 2009
53. Tim J Bull, Alex Schock, J Michael Sharp, Mandisa Greene, Iain J McKendrick, Jill Sales, Richard Linedale, Karen Stevenson. Genomic variations associated with attenuation in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine strains. *BMC Microbiology* 2013, 13:11
54. Vikalp Vishwakarma, Niladri Bhusan Pati, Himanshu Singh Chandel, Sushree Sangeeta Sahoo, Bhaskar Saha, Mrutyunjay Suar. Evaluation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium TTSS-2 Deficient *fur* Mutant as Safe Live-Attenuated Vaccine Candidate for Immunocompromised Mice. *PLOS ONE* December 2012 | Volume 7 | Issue 12 | e52043
55. Javier Santander, Greg Golden, Soo-Young Wanda, and Roy Curtiss. Fur-Regulated Iron Uptake System of *Edwardsiella ictaluri* and Its Influence on Pathogenesis and Immunogenicity in the Catfish Host. August 2012 Volume 80 Number 8 *Infection and Immunity*
56. Felix Bastida and Ramon A Juste. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 2011, 9:8
57. Murray E. Hines, Sue E. Turnquist, Marcia R. S. Ilha, Sreekumari Rajeev, Arthur L. Jones, Lisa Whittington, John P. Bannantine, Raúl G. Barletta, Yrjö T. Gröhn, Robab Katani, Adel M. Talaat, Lingling Li, and Vivek Kapu. Evaluation of novel oral vaccine candidates and validation of a caprine model of Johne's disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 26.
58. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Mar 15;546C:41-52. doi: 10.1016/j.abb.2014.01.029. Epub 2014 Feb 7. Review.
59. Sarman Singh, Krishnamoorthy Gopinath *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's Regional Ileitis: How Strong is Association? *Journal of Laboratory Physicians* / Jul-Dec 2011 / Vol-3 / Issue-2
60. Dubrac S, Touati D. Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2002 Jan;148(Pt 1):147-56.
61. Haraszthy VI, Lally ET, Haraszthy GG, Zambon JJ. Molecular cloning of the *fur* gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* *Infect Immun.* 2002 Jun;70(6):3170-9
62. Milano A, Branzoni M, Canneva F, Profumo A, Riccardi G. The *Mycobacterium tuberculosis* Rv- 2358-*furB* operon is induced by zinc. *Res Microbiol,* 2004;155:192–200.
63. Jiang H, Gao X, Li Y, Xu ZK, Wang LM, Bai XF, Yue Y. Prokaryotic expression and monoclonal antibody preparation of *Mycobacterium tuberculosis* ferric uptake regulator B. *APMIS.* 2008 May;116(5):372-81. doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.00975.x

64. Masse´ E and Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4620–5.
65. Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* 2001;29:5195–206.
66. Protocolo tomado del Manual de Laboratorio de Inmunología del Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 1998