

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Instituto de Ciencias Agrícolas  
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



**Efecto de *Mycobacterium avium* subsp.  
*paratuberculosis* sobre el metabolismo de hierro de  
macrófagos.**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

**M.C. BERTHA LANDEROS SANCHEZ**

**DIRECTORA**

**DRA. SAWAKO HORI OSHIMA.**

**Mexicali, B.C.**

**Diciembre 2012**

## **COMITÉ ASESOR**

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité de tesis indicado, ha sido revisada y aceptada por el mismo, como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias.

---

Dra. Sawako Hori Oshima  
DIRECTORA

---

Dr. Tomas Rentería Evangelista  
ASESOR

---

Dr. Gerardo Medina Basulto  
ASESOR

---

Dra. Alma Rossana Tamayo Sosa  
ASESORA

---

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado  
ASESORA

Esta tesis se realizo en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, de la Universidad Autónoma de Baja California y en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Sawako Hori y del Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme recrear mi vida, sin miedo.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma de Baja California, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado, en especial al M.C. Raymundo Reyes que en ese tiempo fungió como director de la Facultad.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas por permitirme realizar mis estudios de doctorado, por la beca proporcionada de inscripción durante 4 semestres, mi mayor agradecimiento.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por el apoyo recibido durante mis estudios de doctorado, en especial al Dr. Tomas Renteria Evangelista.

A la Dra. Sawako Hori, por permitirme recibir sus enseñanzas incondicionales, por el apoyo brindado y dirección del trabajo experimental, consejos y sugerencias en la escritura de tesis, por su apoyo económico para la realización del trabajo experimental, mi mayor agradecimiento.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su gran apoyo incondicional en la dirección del trabajo experimental, así como también por el apoyo económico en la adquisición de reactivos y materiales para el desarrollo del trabajo experimental, mi mayor agradecimiento.

Al Dr. Gerardo Medina, por sus enseñanzas y consejos para la elaboración del trabajo experimental.

Al Dr. Efrén Díaz, del INIFAP por brindarme la oportunidad de hacer parte del trabajo experimental en su laboratorio, mi mayor agradecimiento.

Al Dr. Daniel Vilte, del INTA, por sus enseñanzas y dirección de parte del trabajo experimental, por su amistad, mi mayor agradecimiento.

A la Dra. Elsa Mercado, del INTA, por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio, por sus enseñanzas, por su amistad, mi mayor agradecimiento.

A la Dra. Marisa Romano, del INTA, por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio, por el apoyo económico en el trabajo experimental de mi tesis.

A ti por ser parte de mis sueños, por tu compañía incondicional, por tu apoyo, por todo.

## DEDICATORIA

*Esta tesis se la dedico a mi madre, por acompañarme en el transcurso de este proyecto tan importante de mi formación y aprendizaje. Por su gran ejemplo de honestidad y resistencia.*

*A mi gran familia, a mis amigos.*

*A mis maestros y alumnos.*

*A, Adriana.*

## ÍNDICE DEL CONTENIDO

### RESUMEN

Resumen.....1

Abstract.....3

### CAPÍTULO 1.

Introducción general.....6

### CAPÍTULO 2.

#### REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enfermedad de Johne.....10

2.1.1 Complejo *Mycobacterium avium*.....13

2.2 Genoma de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.....14

2.3 Macrófagos, Micobacterias y metabolismo de hierro.....15

2.3.1 El metabolismo de hierro en la respuesta inmune innata.....21

2.4 Ferroportina.....24

2.4.1 Ferroportina e inmunidad.....26

2.5 Hefcidina.....26

2.5.1 Regulación de la expresión de ARNm de hepcidina.....28

2.6 Inmunopatogenesis de la PTB.....29

2.7 Vacunas para *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.....33

Bibliografía citada.....35

### **CAPÍTULO 3**

ARTICULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO.....	50
3.1 Polimorfismo genético de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aislado de pacientes de Baja California, México.....	51
3.2 El metabolismo de hierro en la respuesta inmune innata.....	74
3.3 Efecto de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> en la expresión de ARNm de ferroportina, en macrófagos de ratón J774 y macrófagos derivados de monocitos de ovino.....	

### **CAPITULO 4**

Conclusiones generales.....	85
-----------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

UNAM Universidad Nacional Autónoma de México.

UABC Universidad Autónoma de Baja California.

INIFAP Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias.

INTA Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina.

ARNm Acido Ribonucleico mensajero.

ADN Acido Desoxirribonucleico

MAP *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

MTB *Mycobacterium tuberculosis*.

µg Microgramos.

µL Microlitros.

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa.

GAPDH Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa.

DMT1 Proteína Transportadora Metal Divalente 1.

DcytB Proteína duodenal citocromo B.

PTB Paratuberculosis

RFLP Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción.

G+C Guanina y Citocina.

iNOS Proteína Oxido Nítrico Sintetasa.

NO Oxido Nítrico.

INF $\gamma$  Interferón gamma.

IL Interleucina.

TNF $\alpha$  Factor de Necrosis Tumoral alfa.

MHC I Complejo Mayor de Histocompatibilidad I.

MHC II Complejo Mayor de Histocompatibilidad II.

Th1 Linfocitos T helper tipo 1

Th2 Linfocitos T helper tipo 2

CD Receptores de grupos de diferenciación.



## RESUMEN

La Paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). El mecanismo de infección depende de la cantidad de hierro disponible en el huésped; la ferroportina surge como un exportador de hierro único entre las células. Por lo que la ferroportina es un factor crítico para la sobrevivencia de MAP en macrófagos.

Este trabajo se llevo a cabo utilizando macrófagos de ratón J774 y de ovino de cultivos primarios del campo experimental de la UNAM. Los dos tipos de macrófagos fueron tratados con MAP viva a una moi de 1:20 y extracto proteico soluble de MAP a 200µg/ml.

La muestra de estudio consistió en macrófagos tratados con diferentes cantidades de MAP viva, macrófagos tratados con diferentes cantidades de extracto de MAP, macrófagos tratados con hierro, macrófagos tratados con hierro y MAP viva y macrófagos sin tratamiento. De cada una de las muestras se obtuvo el ARNm total para llevar a cabo la amplificación por PCR en tiempo real de un fragmento de ferroportina y de GAPDH como un control interno.

Nuestros resultados muestran que de los macrófagos tanto de ratón como de ovino tratados con MAP viva y extracto de MAP, la expresión de ARNm de ferroportina fue similar con respecto a la de los macrófagos sin tratamiento; sin embargo cuando los macrófagos fueron tratados con hierro, el aumento de la expresión de ARNm de ferroportina fue muy notable; además caso interesante en los macrófagos de ratón y de ovino, en donde se indujo la expresión de

ARNm de ferroportina, con hierro, y se realizo un tratamiento con MAP viva; la expresión de mensajes de ferroportina en los dos tipos de macrófagos bajo considerablemente.

En este trabajo se muestra que la expresión de ARNm de ferroportina en macrófagos de ratón y de ovino con MAP viva y extracto fue similar a los macrófagos sin tratamiento, lo que revela que el efecto de MAP en los macrófagos inhibe la expresión de ARNm de ferroportina probablemente por la necesidad de hierro de la micobacteria o por otro mecanismo dependiente de hierro, tomando en cuenta que la ferroportina aparenta tener una importancia en el mecanismo inicial de la entrada de la micobacteria en el macrófago.

**Palabras clave:** Paratuberculosis, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, ferroportina, expresión de ARN mensajero, cultivos de macrófagos, metabolismo de hierro, PCR en tiempo real.

## ABSTRACT

The Paratuberculosis or Johne's disease is a disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). The mechanism of infection depends on the amount of iron available in the host; the ferroportin emerges as an exporter of iron single between the cells. So the ferroportin is a critical factor for the survival of MAP in macrophages. This work was carried out using macrophage J774 mouse and sheep of primary cultures of the experimental field of the UNAM. The two types of macrophages were treated with viva MAP at an moi of 1: 20 and protein extract of MAP at 200µg/ml. The study sample consisted of macrophages treated with different amounts of living MAP, macrophages treated with different amounts of extract of MAP, macrophages treated with iron, macrophages treated with iron and vivid and macrophages MAP without treatment. Each one of the samples was obtained the total mRNA to carry out amplification by PCR in real time from a fragment of ferroportina and GAPDH as an internal control. Our results show that macrophages both mouse and sheep treated with MAP viva and protein extract of MAP, the expression of ferroportin mRNA was similar with respect to the of macrophages without treatment; However when macrophages were treated with iron, the increase of the expression of ferroportin mRNA was very notable; also interesting case in macrophages in mouse and sheep, where was induced the expression of mRNA of ferroportin, with iron, and realized a treatment with viva MAP; the expression of messages from ferroportin in two types of macrophages considerably low. This work demonstrates that the expression of mRNA of ferroportin in macrophages in mouse and sheep with live MAP and protein

extract was similar to macrophages without treatment, which reveals that the effect of MAP in macrophages inhibits the expression of mRNA of ferroportin probably by the need for iron bacteria or other iron-dependent mechanism taking into account the ferroportin appears to be of importance in the initial mechanism of *Mycobacterium* entry in the macrophage.

**Keywords:** Paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, ferroportin, expression of messenger RNA, crops of macrophages, metabolism of iron, real-time PCR.

# **CAPÍTULO 1**

---

## **Introducción**

## INTRODUCCION GENERAL

La Paratuberculosis es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* siendo una de las enfermedades crónicas más importantes en ganado vacuno. El mecanismo de infección depende de la cantidad de hierro disponible en la célula, de lo que depende directamente el desarrollo del bacilo dentro del macrófago y por lo tanto el desarrollo de la enfermedad (1). La micobacteria produce componentes de unión al hierro como la micobactina y la exoquelina que tienen la función de unirse al hierro extracelular del medio. Esto se ha reportado solo en animales y en humanos, en ganado vacuno las proteínas encargadas de capturar el hierro son la ferritina, la lactoferritina y la transferrina (1).

Las micobacterias son microorganismos intracelulares facultativos el tipo de célula que infectan son los macrófagos, su sobrevivencia depende de la habilidad para capturar los nutrientes de la célula. La captura de estos nutrientes no se dificulta con excepción del hierro, que es capturado por el macrófago para llevar a cabo la respuesta inmune contra este patógeno. Por lo que este atributo se le da a las micobacterias que son radicalmente patógenas como *M. tuberculosis* y *M. avium* con las cuales la concentración de hierro disminuye, lo que no ocurre con *M. smegmatis* (2). Las proteínas que regulan el transporte de hierro se han reconocido como Rv1348 y Rv1349, que son conocidas *Irt A* e *Irt B* respectivamente, estas a su vez son reguladas por otra proteína IdeR, Rv2895 c (3).

La forma en la que las micobacterias utilizan el hierro es por medio de la

liberación de compuestos quelantes llamados sideroforos, nombradas carboximicobactina y micobactina lipofílica que intervienen en la captura del hierro del macrófago al patógeno.

Estos mecanismos de captura y liberación del hierro en la bacteria aun no han sido completamente claros (3)

Una de las proteínas de mayor importancia en la homeostasis del hierro es la hepcidina, fue descrita por primera vez como LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide 1) en 2000 y un año más tarde se correlacionó en el metabolismo del hierro junto a otros genes y proteínas, lo que ha permitido definir la sobrecarga de hierro por su déficit y la anemia inflamatoria por su exceso. Esta proteína tiene propiedades antimicrobianas y antifúngicas in vitro. El gen que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 19, codifica un propeptido de 84 aminoácidos del que por acción enzimática derivan las formas activas C-terminal con 20, 22 y 25 aminoácidos que son ricos en cisteína. La hepcidina es un péptido catiónico con 25 aminoácidos y 4 puentes disulfuro que unen los 8 residuos de cisteína y que determinan su actividad en los 17 aminoácidos que delimitan. La función de la proteína es la de regular la cantidad de hierro presente en la célula. Se ha reportado la función de la proteína relacionada con la posible variación en la estructura y su interacción con regiones de otras proteínas como la ferroportina y se ha encontrado que la proteína se conserva en especies como los primates lo que nos informa que la ferroportina también conserva estas regiones de unión a la hepcidina (4)

La ferroportina surge como un transportador de hierro crítico entre las células y

es el único transportador conocido que exporta el hierro de las células. Por lo que la ferroportina es esencial para la distribución de hierro entre los tejidos y la absorción de hierro en el organismo. ( 5).

Sin embargo el transportador que captura el hierro de la membrana apical no ha sido bien identificado. El hierro del citosol de los enterocitos intestinales puede ser almacenado en la ferritina y también puede ser exportado hacia el plasma por el exportador ferroportina, siendo la única proteína que exporta el hierro de macrófagos, hepatocitos, trofoblastos sincitiales de la placenta y de la mucosa duodenal. Este transporte depende de dos enzimas la ceruloplasmina en la circulación y la hefaestina de la membrana basolateral de los enterocitos, las cuales convierten el  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$  para incorporarlo en la transferrina. La absorción de hierro intestinal es altamente controlada y depende de la necesidad de hierro en el cuerpo. En estudios recientes se ha determinado que este proceso esta acompañado por la modulación de los niveles de expresión de proteínas como DMT1, DcytB y Ferroportina en múltiples niveles (6).

La dependencia de hierro es muy estricta para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) comparado con las otras micobacterias, Debido a esto un cambio leve en la expresión de ferroportina pudiera ser un factor crítico para la sobrevivencia de MAP en macrófagos.

## **CAPÍTULO 2**

---

**Revisión de Literatura**

## 2.1 Enfermedad de Johne.

Los primeros reportes de la enfermedad en ganado vacuno se hicieron en 1807 por Edward Skellet y posteriormente por W.A. Cartwright en 1829, en 1894 se determinan las lesiones ocasionadas por la micobacteria en una vaca que presentaba la enfermedad causada por *M. bovis*, sin embargo la vaca tuvo una reacción negativa para la tuberculina en la piel. Los intestinos, estomago y epiplón de la vaca fueron examinados en la Unidad de patología veterinaria en Dresden por los doctores Heinrich y Albert John y Langdon Frothingham un científico visitante de la Unidad de Patología en Boston Massachusetts. Ellos observaron las características de las lesiones, la mucosa intestinal engrosada y los nódulos linfoides mesentéricos alargados, ellos examinaron que la pared intestinal estaba infiltrada con leucocitos epitelioides y células gigantes ocasionales y con abundantes bacilos ácido resistentes. Infectando puercos de guinea se dieron cuenta que no les causo la enfermedad y que el causante de la enfermedad en la vaca era la causante de la TB en aves, llamada posteriormente *Mycobacterium avium* y en reconocimiento a la similitud de la TB intestinal se le dio el nombre de enteritis pseudotuberculosa en 1895 por Johne y Frothingham (7).

En 1902 en Holanda el Dr. Herman Marcus describió 11 casos de la enfermedad, aunque fallo para aislar los microorganismos, el comento que la enteritis era causada por *M. avium*. En 1912 se logro cultivar la micobacteria por Frederick

William Twort. Posteriormente la enfermedad fue localizada en África y Asia y en Sudamérica en 1930 y para 1970 la enfermedad se distribuyó a nivel mundial. En 1941 Valle y Rinjard demostraron que la inyección subcutánea no causa la enfermedad y que esta medida puede ser utilizada como método de vacunación para el control de la enfermedad; en esta década se reconocieron varias cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* incluyendo cepas pigmentadas y otras que no crecen en medios artificiales. En 1951 el científico Jacob Jansen encontró que el pH del suelo es una variable determinante para la sobrevivencia de la micobacteria (7).

En 1960 se hicieron observaciones importantes de la enfermedad como la secreción de la bacteria en las heces por animales clínicamente normales y la localización de la micobacteria en semen de toros infectados en el útero de vacas infectadas con la posibilidad de infección intrauterina y por consiguiente del feto (7).

En 1970 y 1980 se dio paso a un mejor reconocimiento de la enfermedad, en 1989 empezó la nueva era de la paratuberculosis con el descubrimiento de un elemento genético único de MAP, el segmento de inserción IS900 por J.J. McFadden, este fue el primer elemento de inserción reportado en la micobacteria que sirvió y sirve como un elemento molecular para la diferenciación por PCR de la micobacteria; en este tiempo el microorganismo fue reclasificado de especie *M. paratuberculosis* a subespecies, *M. avium* subsp *paratuberculosis* usando hibridación de DNA- DNA, dando interés solamente a

la naturaleza de MAP y su patogenicidad. Posteriormente el genoma completo de MAP de la cepa K-10 se secuenció en 2005 y esto marco el comienzo de una era de genómica comparativa y funcional de la paratuberculosis (7).

El primer estudio de prevalencia de la infección con MAP en ganado vacuno fue en Dinamarca en 1965, después de esto se han hecho muchos esfuerzos para determinar la prevalencia para lo cual se han desarrollado programas de control. Las pérdidas económicas causadas por la enfermedad no han sido resueltas, aun más con el riesgo zoonótico. Muchos programas de control de la enfermedad se han diseñado basados en la creencia de que la prevalencia es relativamente baja sin basarse en un estudio de prevalencia. Otras razones para determinar la prevalencia de la enfermedad son para determinar el riesgo de la enfermedad en una población animal en particular y analizar la necesidad de servicios de salud particularmente que tengan el riesgo de contraer la enfermedad (8).

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne es una enfermedad en rumiantes que se caracteriza por una enteritis granulomatosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) siendo una de las enfermedades crónicas más importantes en ganado vacuno y ovino. La PTB se caracteriza por un período largo (3-5 años) de la infección latente antes de desarrollar síntomas clínicos, la enfermedad es de distribución mundial. En Estados Unidos de América se encontró que aproximadamente el 22% de las explotaciones lecheras, presentaron al menos una prevalencia del 10%. Dichos rebaños experimentan una pérdida promedio de 40 a 227 dólares por vaca debido a la reducción de la producción de leche, al sacrificio temprano y al

escaso peso de los animales que se enviaron al rastro. En México en un estudio realizado en 2005, sobre el impacto económico de la PTB en bovinos lecheros en el país, se calculó que era de 10,345.00 pesos por vaca al año, con una prevalencia del 8.87% en una población de casi 30,000 bovinos, donde la pérdida se asoció en la producción lechera.

De acuerdo a estudios anatomopatológicos, serológicos, bacteriológicos, así como de biología molecular (PCR, RFLP), se conoce que en 16 estados del país existen frecuencias de 9%, 19.72% y 36% en bovinos, caprinos y ovinos respectivamente en un universo de 7000 muestras (9)

En Baja California, la seroprevalencia global de PTB bovina en vacas pertenecientes a la asociación de productores lecheros en el municipio de Tijuana (AGLPT) fue estimado por el grupo de investigación de salud animal en 8.2% (95% CI 3.2%, 15.9%) (Hori-Oshima *et al*, 2007), que corresponde aproximadamente a 1600 vacas positivas. No existe estudio sistemático de la prevalencia de PTB ovina en Baja California, sin embargo, en el año 2007 en un rancho de ovinos del municipio de Tecate, se observó el efecto devastador causado por esta enfermedad. El primer caso confirmado en este rancho fue en 2005 y el periodo de incubación así como el modo de expansión dentro del rancho mostraron típicos patrones de PTB. Considerando las características de MAP, en resistencia al medio ambiente, diseminación por animales con infección subclínica y su difícil eliminación por desinfectantes, bajo las prácticas de manejo que se emplean en los otros establos lecheros y ranchos de ovinos en Baja California, la propagación de esta enfermedad es eminente.

### **2.1.1 Complejo *Mycobacterium avium*.**

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC), lo integran algunas especies que se caracterizan por un crecimiento lento y que se localizan en el medio ambiente, pero también algunas de importancia veterinaria e importancia clínica.

La clasificación del complejo MAC se basó en un principio en las características fenotípicas que incluyeron las características del crecimiento, el origen del aislamiento y la virulencia en animales de experimentación.

La clasificación tradicional de MAC se basó en las características del cultivo como la pigmentación, la temperatura de crecimiento y actividades bioquímicas (Thorel), aunque la clasificación usada de algoritmos en microbiología clínica no incluye a MAP porque no era considerado un patógeno de humanos.

### **2.2 Genoma de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.**

*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) es un bacilo ácido resistente, que no produce micobactina (10), compuesto que utiliza para la unión al hierro, elemento necesario para el crecimiento de la micobacteria( 10).

MAP es un microorganismo de crecimiento extremadamente lento, la cepa tipo fue aislada en un hato lechero de Wisconsin a mitad de 1970's, esta cepa MAP K-10 se secuenció y contiene 4829781 pares de bases con un contenido de G+C del 69.3%, contiene un solo operón *rrn* (16S-23S-5S). Aproximadamente el 1.5% (72.2 Kb) del genoma de MAP es ADN repetido como por ejemplo las secuencias de inserción, familia de multigenes y genes housekeeping duplicados (10).

Contiene 19 secuencias de inserción diferentes con 58 copias en el genoma, 17 copias de IS900, 7 copias de IS1311 y 3 copias de ISMav2 con 16 secuencias de inserción adicionales. Estos elementos IS son homólogos con otras secuencias de inserción de MTB, *M.avium* , *M bovis* y *M.marinum*, pero también contiene otras secuencias de inserción que no tienen homologías con otros segmentos de inserción de otras micobacterias por ejemplo ISMAP0, presente en 6 copias en MAP K-10, de igual forma ISMAP04 presente en 4 copias no tiene similitud con otras micobacterias, pero tiene similitud con secuencias de inserción con *Arthrobacter nicotinovorans* y *Streptomyces coelicolor*.

Estas secuencias de inserción tienen importancia e interés particular en el diagnóstico por su ausencia en otras micobacterias.(10).

El genoma de MAP presenta 12 homologías para la familia REP13E12, esta es una secuencia de inserción repetida de aproximadamente 1400pb, que fue descrita primero en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*. La mayoría de los elementos IS se encuentran agrupados en regiones intergénicas.

Los requerimientos para su crecimiento en medio Middlebrook 7H9 son el OADC (oleic acid-dextrosa-catalasa), Tween 80 y micobactina J (10).

### **2.3 Macrófagos, Micobacterias y metabolismo de hierro.**

Los macrófagos controlan el contenido de hierro como sistema de defensa contra patógenos mediante la regulación del transporte a partir del suero.

El hierro es esencial para el crecimiento, sobrevivencia y patogénesis de las

micobacterias en macrófagos del huésped, también está involucrado en el sistema de defensa del huésped, catalizando la producción de radicales hidroxilos tóxicos en macrófagos. Por lo que existe una competencia por el hierro entre macrófagos y patógenos durante el transcurso de la infección. Los macrófagos activados tienen varios mecanismos para suprimir el contenido de hierro reduciendo la importación de hierro a partir del suero. Mientras los patógenos bacterianos secretan un grupo de compuestos quelantes de hierro, llamados sideróforos que facilitan el transporte de hierro y que funcionan como sensores. La micobacteria dentro de la célula requiere de estos sensores para monitorear la concentración de hierro en el medio intracelular; también requiere de compuestos que compitan con los del huésped para unirse a proteínas para la adquisición y almacenamiento de hierro, también tendrá que tener la forma de que estas moléculas cargadas de hierro sean transportadas y asimiladas. También las micobacterias requieren de la capacidad de regular la expresión de proteínas dependientes de suministrar la disponibilidad de hierro intracelular. Los sideroforos remueven el hierro de las proteínas del huésped como transferrina, lactoferrina y ferritina, otras moléculas importantes para este fin son el ácido salicílico y el ácido cítrico (11). Los sideroforos lipofílicos están asociados con la pared celular y se llaman micobactinas, el otro tipo son moléculas más polares que son liberadas al medio extracelular, son llamadas carboximicobactinas para el caso de micobacterias patógenas y las exoquelinas liberadas por las micobacterias no patógenas( 12).

Los genes *fecB* y *fecB2* de *Mycobacterium tuberculosis*,(MTB) codifican para proteínas similares a *fecB* de *E.coli*, lo que indica que probablemente también

que MTB puede utilizar la ferrireductasa como fuente de hierro.

Otra de las proteínas importantes como transportador de hierro en MTB es la Mramp la contraparte de Nramp1 en mamíferos.

Se ha reportado el aumento de expresión de ARNm de Mramp de MTB cuando la concentración de hierro o de cobre es mayor en el medio de cultivo, que la normal para su crecimiento, o en *Mycobacterium bovis* BCG cuando los bacilos son crecidos axenicamente o dentro de macrófagos THP-1.

Un grupo de 10 genes llamados micobactina T (mbt) de la A a J codifican para enzimas que forman la micobactina en MTB y están involucrados en la síntesis de sideroforos. (13,14), de igual forma en otras micobacterias como *M.bovis*, *M.avium*, *M.bovis* BCG, *M.ulcerans* y otras. El locus mbt2 incluye genes para transportadores de sideroforos como *IrtA* e *IrtB* (15), un represor dependiente de hierro (*IdrR*), que regula los grupos de genes *mbt* y *mbt2* con dependencia de hierro.

La producción de sideroforos a partir del salicilato es el punto clave para el control de la captura de hierro, ya que el precursor para la formación de micobactina y carboximicobactina es el salicilato (16).

En MTB la micobactina se mantiene dentro de la célula y la carboximicobactina es liberada fuera de la célula, también la carboximicobactina puede separar el hierro del huésped de las transferrinas y lactoferrinas siendo este uno de los mecanismos probables por los cuales la micobacteria asimila el hierro del huésped (17).

Otros genes regulados por la dependencia de hierro y mantenimiento de la homeostasis de hierro es el regulador de captación férrica o *Fur* y el activador o

repressor dependiente de hierro *IdeR* son las dos proteínas principales que regula la expresión de otros genes involucrados también los de síntesis y transporte de sideroforos, los cuales se combinan con el hierro para activar y posteriormente reconocer y unirse a motivos específicos de ADN llamados caja Fur y caja de hierro respectivamente (18,19 ). Son dos proteínas Fur, Fur A y FurB. En el caso de FurA después de unirse al ion férrico se pega a una secuencia de 19 pares de bases que es un pseudopalindroma presente en la región río arriba de un gen y actúa como un repressor. En MTB FurA, tiene actividades regulatorias más específicas, se encuentra localizado en la región río arriba del gen *katG* y los dos loci son genéticamente vinculados en todas las micobacterias. FurA regula negativamente la expresión de *KatG* (20) y auto reprime la transcripción (21). La caja Fur está presente entre la región -14 y -45 del sitio de inicio de la transcripción de *furA* y se traslapa con la región -35 del promotor de *furA*. Por lo tanto además de la unión con el corepressor de hierro, FurA cuando se une a Fur box, limita el acceso o unión eficiente de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción. De forma similar la caja Fur presente río arriba de *katG* causa una represión transcripcional por FurA bajo condiciones ricas de hierro. (21)

Aparte de ser inducido en condiciones ricas de hierro FurA, también se regula durante el estrés oxidativo. La oxidación de residuos de histidina hace que FurA se libere de la caja Fur, permitiendo que el promotor sea reconocido por la RNA polimerasa, para la transcripción. Esta forma operativa y el exceso de hierro intracelular puede producir un estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton (21,22,23) MAP no es capaz de producir sideróforos por si mismo, por

lo que la micobactina (sideróforos) es agregado en medio de cultivo para el crecimiento *in vitro*. Se consideran como criterios principales en identificación de MAP en cultivo bacteriológico su dependencia de micobactina y el período prolongado para que se observen las colonias (24).

En estudios de inmunohistoquímica realizados en 1980's se observó la acumulación de hierro dentro de macrófagos. En animales infectados con *Mycobacteriumn bovis* o *Mycobacterium avium*, se observó la presencia de bacterias y hierro intracelular solo en lesiones de infección inicial, mientras que en células gigantes diferenciadas no se detecto hierro intracelular, dando como resultado un numero reducido de micobacterias intracelulares. En contraste, para el caso de MAP se observó hierro intracelular en lesiones granulomatosas en animales con PTB durante el curso de infección con signos preclínicos y clínicos. Esto sugiere una atenuación del cambio de transporte de hierro, proporcionando una condición única para MAP. Se ha observado la expresión de ferritina, lactoferrina y transferrina en macrófagos infectados con MAP, esto sugiere que estas enzimas participan en el metabolismo de hierro de MAP (1,25).

Se han identificado las moléculas de MAP que responden al aumento del hierro intracelular (26) así como los posibles transportadores de hierro mediante el estudio de genómica comparativa (10,27).

El grupo de genes llamados (*mbtA-J*) son similares en otras micobacterias, con una excepción en MAP que se encuentra truncado en aproximadamente 150 aminoácidos, estos genes codifican para la síntesis de micobactina, sideróforo, necesario para la captura de hierro. Se ha demostrado que a pesar de la

dependencia de micobactina in vitro, MAP sobre regula los genes de síntesis de micobactina dentro de macrófagos bovinos, de forma similar se ha demostrado también que en crecimiento con exceso de hierro y con condiciones limitadas de hierro revelan que hay una regulación de la expresión del gen de almacenamiento de hierro *bfrA*, lo que demuestra que son un conjunto de genes los que mantienen la homeostasis de hierro (10) .

Recientemente se ha demostrado que el gen *IdeR* es un factor transcripcional de MAP, en la presencia de hierro reconoce secuencias consenso en el promotor llamadas cajas de hierro y que regulan la expresión de genes involucrados en la adquisición de hierro (*mbt*) y en el almacenamiento de hierro (*bfrA*) (28,29)

De hecho se ha demostrado que el polimorfismo de estas regiones en el gen *bfrA* en las cepas S (sheep) de MAP resulta en una regulación diferencial del gen con respecto a las cepas C (cattle) MAP.

La sobrevivencia de los macrófagos depende de la habilidad para capturar los nutrientes de la célula. La captura de estos nutrientes no se dificulta con excepción del hierro, que es capturado por el macrófago para llevar a cabo la respuesta inmune contra este patógeno. Por lo que este atributo se le da a las micobacterias que son radicalmente patógenas como *M. tuberculosis* y *M. avium* con las cuales la concentración de hierro disminuye, lo que no ocurre con *M. smegmatis*.

Estos mecanismos de captura y liberación del hierro en MAP aun no han sido completamente claros (30)

### **2.3.1 El metabolismo de hierro en la respuesta inmune innata.**

La respuesta inmune innata sirve como primera línea de defensa contra patógenos e incluye barreras naturales como es la piel, mucosa y ácido gástrico.

En la inmunidad innata están incluidas las células como los monocitos, neutrófilos y células dendríticas las cuales se activan rápidamente para controlar el crecimiento del patógeno y promover la inflamación y posteriormente el desarrollo de la inmunidad adaptativa (31). La identificación inicial de los patógenos está dada por la interacción de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) con ligandos específicos de los patógenos como peptidoglicano, lipopolisacáridos, flagelina y ARN de doble cadena, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o productos de células dañadas del hospedero conocidas como patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs). Los PRRs se clasifican en dos categorías: sensores y fagocíticos que se basan en la activación de cascadas de señales proinflamatorias o en la fagocitosis de patógenos, respectivamente (32). Estas rutas de inmunidad innata inducen varios mecanismos antimicrobianos incluyendo la reducción de hierro disponible para patógenos a nivel celular y sistémico.

El hierro está asociado con representantes de heme que involucra un gran grupo en nuestro cuerpo y que se requiere para el transporte de oxígeno en la hemoglobina, en el almacenamiento de oxígeno, en la mioglobina, en el transporte de electrones y para la función de los citocromos en la respiración

aeróbica. La segunda cantidad de hierro esta en la forma de no hem almacenada en la ferritina. Cuando se necesita el hierro puede ser liberado de la ferritina para cubrir las demandas de hierro en el transporte de oxígeno y metabolismo.

La ferritina circulante dona hierro a la célula por medio de un receptor, también por distribución de hierro en sitios de almacén de tejido periférico como por ejemplo, musculo, medula ósea (33).

La homeóstasis de hierro balancea la necesidad de hierro y por lo tanto limita la toxicidad asociada con la absorción, utilización y almacenamiento de metales.

El organismo tiene desarrollado un alto grado de conservación de hierro cuando este no es eliminado del cuerpo, más que regular la cantidad de hierro en el sistema, el organismo regula la entrada de hierro de la dieta.

La captura de hierro en el epitelio intestinal involucra el transportador de metales divalentes 1 (DMT1). En la salida del hierro a través de los enterocitos hacia la circulación, esta involucrada una proteína llamada ferroportina. Cuando la cantidad de hierro en el cuerpo es baja por pérdida de sangre por ejemplo, la absorción de hierro de la dieta se incrementa primeramente por la acción de la regulación de estas dos proteínas con asociación de enzimas con actividad oxidoreductasas, las cuales ayudan a transportar el hierro en su forma férrica o ferrosa.

El hierro entra en el organismo uniéndose a transferrina y posteriormente es liberado por la circulación portal del hígado. Ningún exceso de hierro no hem

puede ser almacenado en la ferritina del hígado y el hierro circulante se une a la transferrina.

La transferrina se une a la célula por receptores de superficie celular y es internalizada por endocitosis mediada por receptor, en donde la acción del pH ácido mediado por las enzimas hidrolíticas libera el hierro unido a la transferrina. Este mecanismo libera hierro al tejido periférico (34). El sitio dominante para la utilización de hierro es la médula ósea, necesario en la hemoglobinizacion de las células rojas.

El cuerpo tiene un reservorio de hierro en los eritrocitos de cerca de 20-25 mg que son reciclados cada día en la eritrofagocitosis de las células rojas de la sangre por macrófagos en el riñón y sistema reticuloendotelial. Esta liberación de hierro puede ser reciclada y también utilizada o almacenada, la captura de hierro de la dieta diaria esta limitada con únicamente 1-2 mg/día. Este es un mecanismo muy complejo y sensible que responde a la saturación de la unión de hierro por transferrina y otros mecanismos regulatorios incluyendo infección e inflamación, esto ayuda a controlar el metabolismo de hierro para limitar el exceso y prevenir su deficiencia (35).

La activación de fagocitos y de las células derivadas de TH-1 vía PRRs, tiene como consecuencia la disminución de la expresión de receptores de transferrina y expresión de la proteína Nramp1 y ferroportina (36).

La ruta de mayor liberación de hierro hacia el tejido periférico es por medio del receptor de transferrina cuando es endocitado, el hierro se despega de la proteína y es liberado hacia el plasma. La disminución de la regulación del receptor de transferrina limita la habilidad de la célula para adquirir el hierro

unido a la transferrina y reducir el hierro disponible para patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*, *M. avium* y *L. pneumophila*, para restringir su crecimiento (( 36,37,40,41)

Nramp 1 es una proteína transportadora de metales divalentes dependientes de pH que se localiza en los compartimentos del fagosoma y reduce el hierro intrafagosomal (42). La proteína funcional confiere resistencia a parásitos intrafagosomales incluyendo *M. bovis* BCG, *L. donovani* y *Salmonella typhimurium*, aunque los parásitos se escapan para el citosol como *L. monocytogenes* no es afectada por el estado de Nramp1 ( 42,43 ).

En trabajos recientes se ha demostrado que hay supresión de la expresión de la IL-10 por la movilización de hierro por Nramp1 por lo que aumenta la producción de iNOS por los macrófagos para inhibir el crecimiento microbiano (44, 45,46).

## **2.4 Ferroportina.**

La Ferroportina también conocida como Slc40a1, MTP1 O Ireg1 es el único miembro de la familia SLC40 de transportadores de hierro (47), es una proteína de transmembrana localizada en, macrófagos, enterocitos del duodeno, hepatocitos, células tubulares del riñón: Aunque también se ha localizado en los eritrocitos, su función en estas células no es clara (48) .El hierro sale unido a la ferroportina, que se deberá convertir de ferroso a férrico que es menos perjudicial para la célula (49).. La ferroportina es la única proteína conocida que transporta el hierro desde el interior del citoplasma de la célula hacia el plasma (50) La actividad de transporte de metal no ha sido aun bien estudiada aunque

existe la evidencia de la actividad de transporte de fierro, aunque también puede transportar otros metales esta actividad es menos eficiente porque tiene una baja afinidad para otros metales (51). La ferroportina es una proteína con los dominios amino y carboxilo terminal en el citosol. La proteína funciona como un monómero o un oligómero, contiene 12 dominios transmembrana (52).

Aunque se tiene evidencia de que su estructura es multimerica, por lo que también se considera que la ferroportina se comporte como un dímero.(53).

La regulación de la ferroportina a nivel transcripcional y traduccional se lleva a cabo por el hierro presente (54) la expresión aumenta por una sobrecarga más que por una deficiencia de hierro, en macrófagos de pulmón y bazo, lo que causa una baja expresión en macrófagos de ratón con inflamación aguda (55). Este mecanismo no está bien estudiado, pero se cree que la hepcidina podría estar involucrada como regulador de la inflamación aguda (56,57,58). (En la región 5'UTR no traducible de la ferroportina se localizan regiones muy conservadas llamadas IRE lo que indica su importancia en este mecanismo regulatorio. Esta región IRE se une a proteínas represoras llamadas IRP1 e IRP2 (59). La acción de unión del IRE de ferroportina a las proteínas represoras es para regular la traducción, aunque no se conoce con detalle la cantidad de hierro que es necesaria para la regulación de la proteína a nivel transcripcional o traduccional (60).

### **2.4.1 Ferroportina e inmunidad.**

El equilibrio de la cantidad de hierro circulante en los organismos eucariotas requiere de un balance en la adquisición y utilización del hierro. Uno de los mecanismos existentes para regular la utilización de hierro en el plasma ya sea la entrada o la salida es la eritropoyesis, la cual requiere de una coordinación entre el tejido que utiliza el hierro y el almacenamiento de hierro con las células que transportan el hierro al plasma. Esta comunicación es mediada por la hepcidina, que es un pequeño péptido que funciona como una hormona (57).

La ferroportina se sobreexpresa en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* e inhibe el crecimiento intracelular de la micobacteria, restringiéndose la cantidad y disponibilidad de hierro en el citosol, además de regular la expresión de iNOs en macrófagos con una sobredosis de hierro, por lo que esta participación en la atenuación de la expresión de estas moléculas que participan en la inmunidad innata, llevan a que la ferroportina se sobreexprese, y module la respuesta de forma negativa en la expresión de estas moléculas, en forma particular a nivel traduccional para el caso de iNOs y también disminuye la producción de NO. En este efecto la ferroportina interactúa con la Jak2 cinasa, lo que permite creer que la ferroportina también participa en la modulación de cascadas de señalización. (61).

## **2.5 Hecidina**

Una de las proteínas de mayor importancia en la homeostasis del hierro es la hepcidina, fue descrita por primera vez como LEAP-1 (liver-expressed

antimicrobial peptide 1) en el año 2000 y posteriormente un año más tarde se correlacionó esta proteína en el metabolismo del hierro junto a otros genes y proteínas, lo que ha permitido definir la sobrecarga de hierro por su déficit y la anemia inflamatoria por su exceso. Esta proteína tiene propiedades antimicrobianas y antifúngicas *in vitro*. La hepcidina es una hormona, péptido producido en el hígado en respuesta a la acumulación de hierro (62), por lo que la función de la proteína es la de regular la cantidad de hierro presente en los organismos eucariotas que fue descubierto por su función principal en el mantenimiento de homeóstasis de hierro intracelular en humanos y otros mamíferos. El gen que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 19, codifica un propéptido de 84 aminoácidos del que por acción enzimática derivan las formas activas C-terminal con 20, 22 y 25 aminoácidos que contiene 6 cisteínas, lo cual resulta con un gran número de enlaces disulfuro (63).

Se ha reportado la función de la proteína relacionada con la posible variación en la estructura y su interacción con regiones de otras proteínas como la ferroportina y se han localizado las regiones de unión (64).

La hepcidina es miembro de la familia de las defensinas, es la única que es elaborada por los hepatocitos, las otras defensinas se elaboran en las células epiteliales y es altamente conservada en todos los vertebrados (63).

### 2.5.1 Regulación de la expresión de RNAm de Hecpidina.

La regulación a nivel transcripcional de la expresión de RNA mensajero de hepcidina aumenta por citocinas inflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) en hepatocitos humanos así también por lipopolisacaridos (LPS) (65). Posteriormente, los LPS en macrófagos alveolares inducen aumento de RNAm de hepcidina y transportadores de hierro incluyendo el transportador 1 divalente de metales (DMT1) y la ferroportina 1 (FPN1) (66).

Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares por los que MAP influye a modular el metabolismo de hierro en macrófagos favoreciendo para la acumulación de hierro en macrófagos. Actualmente se ha reportado que en células de cultivo de macrófagos humanos como en macrófagos derivados de ratón se ha observado un aumento significativo de la expresión de hepcidina como efecto sinérgico de la estimulación de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*. Se ha observado un aumento significativo de la expresión de hepcidina (250-500 veces) como efecto sinérgico de la sensibilización con los dos estimulantes *Mycobacterium tuberculosis* e INF $\gamma$ . Así mismo la estimulación con *M avium* e INF $\gamma$  mostro el mismo efecto sinérgico significativo en inducción de RNAm de hepcidina (40-100 veces). Sin embargo no se han esclarecido las significancias biológicas del efecto sinérgico y la estimulación por cada una de las dos micobacterias que condujeron a un aumento leve (25-50 veces en *M. tuberculosis*, 3 veces en *M. avium*) del nivel de RNAm. Además los cultivos de líneas celulares de macrófagos sin o con infección con estas micobacterias *in vitro*, no representan la situación exacta

de los macrófagos en animales infectados por micobacterias (67). Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares por los que MAP influye a modular el metabolismo de hierro en macrófagos favoreciendo para la acumulación de hierro en macrófagos.

## **2.6 Inmunopatogénesis de la PTB.**

MAP es un microorganismo intracelular facultativo que infecta macrófagos, su crecimiento en el laboratorio requiere un período prolongado de 2 – 6 meses el mecanismo de entrada es por fagocitosis. La actividad antimicrobial es mediada por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por medio de citocinas que incrementan la actividad antimicrobial de los macrófagos. El INF $\gamma$  es el mayor regulador de la respuesta inmune para las micobacterias, induce la expresión de la proteína óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2) hasta la producción de óxido nítrico (NO) (68). Hasta la acidificación del fagosoma, en el caso de macrófagos de bovino la expresión de la ATPasa tuvo significancia, después de las 18 horas de infección (69).

La ruta de infección en rumiantes es por ingestión hacia la superficie de la mucosa (70), siendo el portal de entrada de MAP las células M. La superficie interrumpida de las células permite a MAP transitar a través de las células M, este tránsito se lleva a cabo durante 30 minutos (71).

La forma en que MAP inicia la entrada hacia las células M es reconociendo por medio de la fibronectina y las  $\beta$ 1 integrinas de las células M, otro receptor que

distingue a MAP en las células M son los receptores Toll like de tipo (TLR's), que están presentes en la membrana de macrófagos y células dendríticas, que funcionan como patrones de reconocimiento (72).

La respuesta inmune innata inicia con el tránsito de MAP hasta ser fagocitado por los macrófagos y células dendríticas por medio de TLR2, MAP puede permanecer intacto frustrando los mecanismos bactericidas de la célula presentadora de antígeno (APC), o ellas pueden procesar y presentar el antígeno a los linfocitos T (73).

Como patógeno intracelular, MAP puede sobrevivir en el macrófago inhibiendo la maduración del fagosoma, por una disminución en la acidificación del fagosoma y una consecuente inhibición de replicación de MAP. De esa forma se favorece la vía de señales de transducción de las protein cinasas (MAPK) que resulta en un incremento de la expresión de IL-12 y disminución de la IL-10 en macrófagos infectados con MAP. La neutralización con anticuerpos IL-10 incrementa la muerte de MAP por un incremento en la acidificación del fagosoma y producción de óxido nítrico (74).

La activación del receptor TLR2 en macrófagos y células dendríticas sirve como un enlace de la respuesta inmune innata y adquirida. El inicio de la respuesta inmune adquirida continúa por la vía de activación de MyD88 (75).

Los macrófagos activados por las micobacterias producen citoquinas como la IL-1, TNF $\alpha$  e IL-12, además de IL-6, IL-8 e IL-10 (76,77,78,79,80,81).

La presentación de antígeno en el macrófago por medio del complejo mayor de

histocompatibilidad MHC-II, permite la secreción de IL-1, activando los linfocitos T. Los linfocitos T activados expresan IL-2 la cual permite la expansión clonal de linfocitos T, CD4+ y CD8+. Las células T CD4+ iniciales, pueden diferenciarse en poblaciones Th1 y TH2 dependiendo de la naturaleza del antígeno.

Esta diferenciación puede inclinarse hacia el tipo Th1 si es un estado temprano de la infección o fase subclínica de MAP, caracterizado por una secreción de citocinas como INF $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$ , que la caracteriza por grandes de expresión de INF $\gamma$  en sangre periférica (82,83).

El INF $\gamma$  en los macrófagos juega un papel importante en la activación de linfocitos T, macrófagos, maduración de células dendríticas y sobreexpresión de MHC-I y II y también de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Sin embargo en el caso de MAP no hay un suficiente estímulo de producción de especies reductoras de oxígeno al igual que la activación de los macrófagos por el INF $\gamma$  cantidad que es inadecuada para matar a MAP. MAP secreta SOD (superóxido dismutasa), la cual puede ser un mecanismo protector intracelular de MAP. En el primer año de infección, las células de memoria CD4+ predominantes con un fenotipo CD4+CD45RO+, expresan grandes cantidades de CD25 y CD26, en cambio las células CD8+CD45RO+, expresan bajos niveles de CD25 y CD26 en el inicio de la enfermedad y después de 18 meses aumentan su expresión, es decir en la fase tardía (84).

Las células  $\gamma\delta$ T juegan un papel importante en la infección micobacterial en la formación de granulomas aumentando la producción de INF $\gamma$  (85)

El progreso de la fase subclínica a clínica de la PTB, esta asociada con un

cambio de respuesta de Th1 a TH2, con la producción de citosinas IL-4, IL-5 e IL-10, apoyando la respuesta humoral, caracterizada por la expansión clonal de células B, secreción de inmunoglobulinas y control de la inmunidad por las células Th1. Ambas IL-4 e IL-10 suprimen la expresión de INF $\gamma$  en las células Th1 CD4+ (86).

La IL-10 parece ser que juega un papel importante en la infección micobacterial y específicamente en el caso de MAP. Se ha observado un aumento en la expresión de IL-10 en el tejido de íleon, nódulos linfáticos mesentéricos y células mononucleares en cultivo de vacas y ovinos naturalmente infectados, (87), de igual forma aumento la expresión de IL-10 en macrófagos derivados de monocitos infectados con MAP, comparados con *M. avium* subsp. *avium*, (88). Así mismo afirmando esta acción de la IL-10, se trataron cultivos de macrófagos de bovino y se les hizo tratamientos con IL-10, en los cuales disminuyó la expresión de INF $\gamma$  (89).

En la fase tardía de la infección hay un incremento de las células B en animales con signos subclínicos, el papel de estas células no ha sido bien entendido, sin embargo estas células actúan como células presentadoras de antígeno y juegan un papel importante en la activación de las células Th2 CD4+. Un número notorio de células B se observó en vacas naturalmente infectadas, demostrando los signos clínicos de la paratuberculosis, comparado con otras vacas con infección subclínica y sanas (90).

Recientemente se ha reportado una subpoblación de células B CD5 bright, en sangre periférica en vacas infectadas en la fase subclínica, con MAP, lo que posiblemente representa la población B1a (91), lo que sugiere determinar que

el cambio de población de células B, se lleva a cabo durante la infección lo cual directa o indirectamente puede afectar la patogénesis inducida por las células T inflamatorias.

Las lesiones granulomatosas son la característica de la acción de MAP en la infección y la composición de los tipos celulares en el sitio depende del estadio de la infección.

## **2.7 Vacunas para MAP.**

Las vacunas disponibles a la fecha son vacunas con micobacterias completas vivas sin adyuvantes que no han tenido mucho éxito de protección (92). Otras son las de tipo recombinante, utilizando antígenos específicos, que inducen una buena respuesta inmune de tipo Th1, como es el caso de la proteína SOD (superóxido dismutasa) que es una proteína que interfiere contra la propiedad bactericida de la enfermedad y tiene propiedades antiapopticas (93).

Otro antígeno utilizado es el del complejo 85 A, B y C, que son proteínas altamente conservadas en el genoma de las micobacterias (94)

Las proteínas Hsp65 (GroEL) y Hsp70 (DnaK), de heat-shock y que funcionan como chaperonas en el plegamiento de proteínas, pueden inducir inmune celular, aunque la Hsp70 produce una respuesta inmune más fuerte (95).

La proteína P22 induce una buena respuesta de anticuerpos cuando se administra como proteína recombinante (96). Otra lipoproteína es la de 19 KD que produce una buena respuesta humoral pero débil respuesta para INF $\gamma$  (97).

Aun no se conocen los mecanismos completos inmunopatológicos de la enfermedad, por lo que aun no se saben los mecanismos importantes por los que MAP sobrevive dentro de macrófagos y que se deberían de tomar en cuenta para elaborar estrategias que eliminen a la micobacteria, así como pruebas de diagnóstico con buena sensibilidad, ya que una buena porción de animales subclínicos que no son diagnosticados permanecerían como fuente constante de la infección. Pero una vacuna no es suficiente, si no se aplican las prácticas de buen manejo en los rebaños, en los animales adultos y recién nacidos.

En la patogénesis de la PTB se conoce la transición del sistema inmunológico de huésped durante la infección (98,99).

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 (100), pero la causa de transición de inmunidad celular a humoral así como los eventos inmunopatológicos que provocan desarrollo de síntomas clínicos aun quedan desconocidos.

Debido a la característica de MAP con dependencia estricta al hierro, un pequeño desbalance en el metabolismo de hierro en macrófagos podría tener un efecto crítico y pudiera considerarse como un disparador del establecimiento de infección subclínica o desarrollo de síntomas clínicos.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- 1.- Eiichi Momotani, Kou Furugouri, Yoshiaki Obara, Yasuhiko Miyata, Yoshiharu Ishikawa, and Tomoo Yoshino. Immunohistochemical Distribution of Ferritin, Lactoferrin, and Transferrin in Granulomas of Bovine Paratuberculosis. 1986. *Infection and Immunity*, 1986. 52;2 p. 623-627.
- 2.- Anthony J. Harrison, Minmin Yu, There's Gårdenborg, Martin Middleditch, Rochelle J. Ramsay, Edward N. Baker, and J. Shaun Lott. The Structure of MbtI from *Mycobacterium tuberculosis*, the First Enzyme in the Biosynthesis of the Siderophore Mycobactin, Reveals It To Be a Salicylate Synthase. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188;17, p6081–6091.
- 3.- Aisha Farhana, Sandeep Kumar, Shailendra S. Rathore, Prahlad C. Ghosh, Nasreen Z. Ehtesham, Anil K. Tyagi, and Seyed E. Hasnain. (2008). Mechanistic Insights into a Novel Exporter-Importer System of *Mycobacterium tuberculosis* Unravel Its Role in Trafficking of Iron. *PLoS ONE.*; 3(5):e2087.
- 4.- Ludovica Segat, Alessandra Pontillo, Michele Milanese, Alessandro Tossi, and Sergio Crovella. 2008. Evolution of the hepcidin gene in primates *BMC Genomics*. 2008 Mar 5;9:120.).
- 5.- Ward DM, Kaplan J. 2012. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation.. *Biochim Biophys Acta*. Sep;1823(9):1426-33.
- 6.- Zhang A-S, Enns CA (2009) Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology* 2009: 207–214.
- 7.- Marcel A. Behr (ed.) and Desmond M. Collins (ed.). (2010). *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control*. London, UK: CAB International, pag. 1-9.

- 8.- Marcel A. Behr (ed.) and Desmond M. Collins (ed.). (2010). Paratuberculosis, Organism, Disease, Control. London, UK: CAB International, pag. 10-22.
- 9.- Plan estratégico del programa de atención de la paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México, Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal, 2010; conasamexico.org.mx).
- 10.- Li, L.L., et al., (2005). *The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(35): p. 12344-12349.
- 11.- Sharmistha Banerjee, Aisha Farhana, Nasreen Z. Ehtesham, Seyed E.Hasnain. 2011 Iron acquisition assimilation and regulation in micobacteria. Infection, Genetics and Evolution 11(2011) 825–838.
- 12.- De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Barry 3rd, C.E.,1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria.J.Bacteriol.181, 4443–4451.
- 13.- De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Su, H., Zhu, Y., Barry 3rd,C.E., 2000. The salicyl-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth in macrophages.Proc.Natl.Acad.Sci.USA97,1252–1257
- 14.- Quadri, L.E.,Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H., Walsh ,C.T.,1998. Identification of a Mycobacterium tuberculosis gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin.Chem.Biol.11, 631–645
- 15.- Rodriguez, G.M., Smith, I.,2006. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in Mycobacterium

tuberculosis. *J. Bacteriol.* 188, 424–430.

16.- Zwahlen, J., Kolappan, S., Zhou, R., Kisker, C., Tonge, P. J., 2007. Structure and mechanism of MbtI, the salicylate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 46, 954–964.

17.- Gobin, J., Horwitz, M. A., 1996. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J. Exp. Med.* 183, 1527–1532.

18.- Baichoo, N., Helmann, J. D., 2002. Recognition of DNA by Fur: an interpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* 184, 5826–5832.

19.- Rodriguez, G. M., Smith, I., 2006. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 188, 424–430

20.- Zahrt, T. C., Song, J., Siple, J., Deretic, V., 2001. Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene *katG*. *Mol. Microbiol.* 39, 1174–1185.

21. Sala, C., Forti, F., Di Florio, E., Canneva, F., Milano, A., Riccardi, G., Ghisotti, D. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* FurA autoregulate its own expression. *J. Bacteriol.* 185, 5357–5362.

22.- Lucarelli, D., Vasil, M. L., Meyer-Klaucke, W., Pohl, E., 2008. The metal dependent regulators FurA and FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1548–1560.

23.- Zahrt, T. C., Song, J., Siple, J., Deretic, V., 2001. Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene *katG*. *Mol. Microbiol.* 39, 1174–1185.

- 24.- Merkal, R.S. and B.J. Curran, *Growth and Metabolic Characteristics of Mycobacterium-Paratuberculosis*. Applied Microbiology, (1974). 28(2): p. 276-279.).
- 25.- Momotani, E., D.L. Whipple, and A.B. Thiermann, (1988). *The distribution of ferritin, lactoferrin and transferrin in granulomatous lymphadenitis of bovine paratuberculosis*. . Journal of Comparative Pathology, 99: p. 205-214.
- 26.- Barclay, R. and C. Ratledge, (1983). *Iron-Binding Compounds of Mycobacterium-Avium, Mycobacterium-Intracellulare, Mycobacterium-Scrofulaceum, and Mycobactin-Dependent Mycobacterium-Paratuberculosis and Mycobacterium-Avium*. Journal of Bacteriology, **153**(3): p. 1138-1146.
- 27.- Yellaboina, S., et al., (2006). Comparative analysis of iron regulated genes in mycobacteria. Febs Letters, 580(11): p. 2567-2576.).
- 28.- Janagama HK, Senthilkumar TM, Bannantine JP, Rodriguez GM, Smith I, Paustian ML, McGarvey JA, Sreevatsan S. (2009) .Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Microbiology. Nov;155(Pt 11):3683-90. Epub Aug 14.)
- 29.- Janagama HK, Senthilkumar, Bannantine JP, Kugadas A, Jagtap P, Higgins L, Witthuhn B, Sreevatsan S. (2010). Iron-sparing response of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis is strain dependent.BMC Microbiol. Oct 22;10:268. doi: 10.1186/1471-2180-10-268.
- 30.- Aisha Farhana, Sandeep Kumar, Shailendra S. Rathore, Prahlad C. Ghosh, Nasreen Z. Ehtesham, Anil K. Tyagi, and Seyed E. Hasnain. (2008). Mechanistic Insights into a Novel Exporter-Importer System of *Mycobacterium tuberculosis* Unravel Its Role in Trafficking of Iron.. PLoS ONE.; 3(5): e2087.).

- 31.- S.C. Eisenbarth, R.A. Flavell, (2009). Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome, *EMBO Mol. Med.* 1, 92-98.
- 32.- S. Khare, N. Luc, A. Dorfleutner, C. Stehlik. (2010). Inflammasomes and their activation, *Crit. Rev. Immunol.* 30, 463-487).
- 33.- E.C. Theil, Iron homeostasis and nutritional iron deficiency, *J. Nutr.* 141 (2011) 724Se728S.).
- 34.- J. Wang, K. (2011) .Pantopoulos, Regulation of cellular iron metabolism, *Biochem. J.* 434 365-381.)
- 35.- T. Ganz, (2011) .Hepcidin and iron regulation, 10 years later, *Blood* 117 4425-4433).
- 36.- T.F. Byrd, M.A. Horwitz, Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron, *J. Clin. Invest.* 83 (1989) 1457-1465. (
- 37.- T.F. Byrd, M.A. Horwitz, Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 969-976.
- 38.- M. ter-Koltunoff, S. Goren, J. Nussbeck, C.G. Feng, A. Sher, K. Ozato, A. Azriel, B.Z. Levi, Innate immunity to intraphagosomal pathogens is mediated by interferon regulatory factor 8 (IRF-8) that stimulates the expression of macrophage-specific Nramp1 through antagonizing repression by c-Myc, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 2724-2733.
- 39.- M. Nairz, G. Fritsche, P. Brunner, H. Talasz, K. Hantke, G. Weiss (2008).

Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*, *Eur. J. Immunol.* 38 1923-1936.).

40.- D.L. Clemens, M.A. Horwitz, (1996). The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin, *J. Exp. Med.* 184 1349-1355.

41.- O. Halaas, M. Steigedal, M. Haug, J.A. Awuh, L. Ryan, A. Brech, S. Sato, H. Husebye, G.A. Cangelosi, S. Akira, R.K. Strong, T. Espevik, T. H. Flo, (2010). Intracellular *Mycobacterium avium* intersect transferrin in the Rab11(b) recycling endocytic pathway and avoid lipocalin 2 trafficking to the lysosomal pathway, *J. Infect. Dis.* 201, 783-792.

42.- M.F. Cellier, P. Courville, C. Champion, (2007). Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense, *Microb. Infect.* 9, 1662-1670.).

43.- J.R. Forbes, P. Gros, (2001). Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions, *Trends Microbiol.* 9 397-403.).

44.- M. Nairz, G. Fritsche, P. Brunner, H. Talasz, K. Hantke, G. Weiss, (2008). Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*, *Eur. J. Immunol.* 38 1923-1936.

45.- Nairz, I. Theurl, S. Ludwiczek, M. Theurl, S.M. Mair, G. Fritsche, G. Weiss, (2007). The co-ordinated regulation of iron homeostasis in murine macrophages limits the availability of iron for intracellular *Salmonella typhimurium*, *Cell Microbiol.* 9 2126-2140.

46.- M. Nairz, G. Fritsche, M.L. Crouch, H.C. Barton, F.C. Fang, G. Weiss, (2009). Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition, *Cell Microbiol.* 11 1365-1381).

- 47.- Andrew T Mckie and David J. Barlow. 2004. The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1. *Eur J Physiol* , 447: 801-806)
- 48.- Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA (2009) A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab* 9(5):461–73.
- 49.- Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C. (1992). Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med* Mar-Apr;7(2):145-53.
- 50.- Beaumont C, Delaby C (2009) Recycling iron in normal and pathological states. *Semin Hematol* 46(4):328–38.
- 5.-1 De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, et al. (2007) *Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. Embo J* 26(12):2823–31.
- 52.- Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA (2009) A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab* 9(5):461–73.}
- 53.- De Domenico I, Ward DM, Musci G, Kaplan J. (2007). Evidence for the multimeric structure of ferroportin. *Blood*;109(5):2205-9.
- 54.- Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in the intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000;275:19906-12.
- 55.- Yang F, Liu XB, Quinones M, Melby PC, Ghio A, Haile DJ. (2002) Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by

inflammation. *J Biol Chem* 277:39786-39791

56.- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8780-8785.

57.- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-7810.

58.- Pigeon C, Ilyin G, Courseland B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (2001). A new mouse liver specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276:7811-7819.

59.- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Heidiger MA, Hentze MW, Simpson RJ (2000). A novel duodenal iron regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* 5:299-309.

60.- Andrew T McKie and David J. Barlow. 2004. The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1. *Eur J Physiol* , 447: 801-806).

61.- Johnson EE, Sandgren A, Cherayil BJ, et al. Role of ferroportin in macrophage-mediated immunity. *Infect Immun.* 2010;78:5099–106.

62.- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human

antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressedduring iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276:7811–9)

63.- De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM, Phillips JD, Ajioka RS, Kay MS, Kushner JP, Ganz T, Ward DM, Kaplan J. The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab.* 2008;8:146–56.

64.- Ludovica Segat, Alessandra Pontillo, Michele Milanese, Alessandro Tossi, and Sergio Crovella. (2008). Evolution of the hepcidin gene in primates. *BMC Genomics*, 9:120.

65.- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., McVey Ward, D., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090–2093.

66.- Ngoc-Bich Nguyen, Kimberly D. Callaghan, Andrew J. Ghio, David J. Haile, and Funmei Yang. (2006). Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L417–L425, .  
Ngoc-Bich Nguyen, Kimberly D. Callaghan, Andrew J. Ghio, David J. Haile, and Funmei Yang. (2006). Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L417–L425.

67.- Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, Schlesinger LS, Zwilling BS, et al. (2007) Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *Journal of Leukocyte Biology* 82: 934–945 doi:10.1189/jlb.0407216.

68.-Souza CD, Evanson OA, Weiss DJ 2006 Mitogen activated protein kinase p38 pathway is an important component of the anti-inflammatory response in

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected bovine monocytes. *Microb Pathog.*41(2-3):59-66).

69.- Weiss DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamsen MS.(2004) Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. *Microb Pathog.*37(4):215-24.

70.- Featherstone,C. (1997). M cells: Portals to the mucosal immune system. *Lancet* 350, 1230.

71.- Sigurdardóttir, Ó. G., A. M. Bakke-McKellep, B. Djønne, and Ø. Evensen. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 28:223-230).

72.- Krutzik, S.R. and Modlin, R.L.(2004). The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Seminars in Immunology* 16, 35-41. Nguyen, L and Pieters,J.( 2005). The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends in Cellular Biology* 15, 269-276.

73.- Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Cheville N(2003) Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. ,4:269-83.

74.- Weiss DJ, Evanson OA, de Souza C, Abrahamsen MS (2005) *Am J Vet Res.* 2005 Apr;66(4):721-6. A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp

paratuberculosis.).

75.- Krutzik, S.R. and Modlin, R.L.(2004). The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Seminars in Immunology* 16, 35-41. Nguyen, L and Pieters,J.( 2005). The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends in Cellular Biology* 15, 269-276.

76.- Jun Wang, Julia Wakeham, Robin Harkness, and Zhou Xing (1999). Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest.* 103(7): 1023–1029.

77.- Hope JC, Thom ML, McCormick PA, Howard CJ. (2004).Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet Immunol Immunopathol.* 100(3-4):187-95

78.- Adams, J.L. and Cruprynski, c.J.(1994). Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF-alpha, IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microbial Pathogenesis* 16, 401-411.

79.- Coussens, PM, Verman N, Coussens MA, Elftman MD, McNulty AM. (2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun.*72(3):1409-22.

80.- Weiss DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamsen MS (2004). Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. *Microb Pathog.* Oct;37(4):215-24.

- 81.- Motiwala AS, Janagama HK, Paustian ML, Zhu X, Bannantine JP, Kapur V, Sreevatsan S. 2006 Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect Immun.* Nov;74(11):6046-56.
- 82.- Burrells C, Clarke CJ, Colston A, Kay JM, Porter J, Little D, Sharp JM (1999). Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with *paratuberculosis* (Johne's disease). *Vet Immunol Immunopathol.*68(2-4):139-48.
- 83.- Stabel JR.( 2000) Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* Jul;61(7):754-60.
- 84.- Koo, H.C., Park, Y.H. Hamilton, M.J. Barrington, G.M. Davis, W.C. (2004). Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected calves. *Infection and Immunity*, 72, 6870-6883.
- 85.- Kaufmann,S.H.(1996) Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93, 2272-2279.
- 86.- Peleman, R.,Wu, J., Fargeas, C. and Delespesse, G. (1989). Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferón gamma by human mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine* 170, 1751-1756.
- 87.- Coussens, PM, Verman N, Coussens MA, Elftman MD, McNulty AM.

(2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun.*72(3):1409-22.

88.- Weiss DJ, Evanson OA, Moritz A, Deng MQ, Abrahamsen MS. (2002). Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect Immun.* 70(10):5556-61.

89.- Khalifeh MS, Stabel JR. (2004). Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infect Immun.* 72(4):1974-82.

90.- Waters W R, Stabel J R, Sacco R E, Harp J A, Pesch B A, Wannemuehler M J. (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infect Immun.*;67:1593–1598.

91.- Stabel, J.R. and Khalifeh, M.S. (2008). Differential expression of CD5 on B lymphocytes in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126, 211-219.

92.- Begg, DJ y Griffin, JF. (2005). Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy vaccine. *10; 23(42): 4999-5008.*

93.- Hinchey J, Lee S, Jeon BY, Basaraba RJ, Venkataswamy MM, Chen B, Chan J, Braunstein M, Orme IM, Derrick SC, Morris SL, Jacobs WR Jr, Porcelli

- SA. (2007). Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*. Aug;117(8):2279-88.
- 94.- Sung Jae Shin , Chao-Fu Chang, Ching-Dong Chang, Sean P. McDonough, Belinda Thompson, Han Sang Yoo and Yung-Fu Chang. (2005). In Vitro Cellular Immune Responses to Recombinant Antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *Infect. Immun*, 73;8, 5074-5085.
- 95.- Koets AP, Rutten VP, Hoek A, Bakker D, van Zijderveld F, Müller KE, van Eden W. (1999). Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1;70(1-2):105-15.
- 96.- Rigden RC, Jandhyala DM, Dupont C, Crosbie-Caird D, Lopez-Villalobos N, Maeda N, Gicquel B, Murray A. (2006) Humoral and cellular immune responses in sheep immunized with a 22 kilodalton exported protein of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Med Microbiol.*, 55:1735-40.
- 97.- Huntley JF, Stabel JR, Bannantine JP. 2005 Immunoreactivity of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 19-kDa lipoprotein. *BMC Microbiol*. 21; 5:3.
- 98.- Coussens, P.M., (2001). *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Animal Health Research Reviews*, 2(2): p. 141-161
- 99.- Stabel, J.R., (2000). *Transitions in immune responses to Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4): p. 465-473.
- 100.- Buza, J.J., et al. (2004). Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in experimentally infected cattle with paratuberculosis.

Infection and Immunity,. 72(4):2425-2428.

## **CAPÍTULO 3**

---

**Artículos generados durante el presente estudio**

**3.1 Polimorfismo genético de *Mycobacterium tuberculosis* aislado de pacientes de Baja California, México. Polimorfismo genético de *Mycobacterium tuberculosis* aislado de pacientes de Baja California, México.**

**Genetic polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in patients of Baja California, México.**

Autores:

Amelia Portillo López\*, Bertha Landeros Sánchez, Verena Diveni Aguilar,  
Sawako Hori

**Autor para correspondencia:**

\*Amelia Portillo-López, [portillo@uabc.edu.mx](mailto:portillo@uabc.edu.mx), Tel/Fax: 646 1744560

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Km 103  
carretera Tijuana-Ensenada, Baja California, México. CP 22860

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa que afecta a una tercera parte de la población mundial. En México el estado de Baja California es el mayormente afectado con la tasa de incidencia y mortalidad más alta de 35.34 y 8.05 por 100,000 habitantes, respectivamente. El propósito de este estudio fue determinar el polimorfismo genético de *Mycobacterium tuberculosis* en Baja California, a fin de establecer una relación de los genotipos con respecto a su prevalencia y/o endemismo en el área. Para ello se analizaron un total de 43 cepas utilizando los marcadores moleculares MIRU4, MIRU40 y VNTR1955 (Mtub21). Este conjunto demostró 16 patrones, con una alta similitud genética, analizada mediante el Índice de similitud de Jaccard. Por otro lado el Índice de diversidad de Shannon, de rareza de Pielou y el Índice discriminatorio de Hunter-Gaston fueron altos para el conjunto de locus analizados. Este es el primer estudio molecular de cepas de *M. tuberculosis* en Baja California y muestra su origen a través de una cepa común, basado en su similitud.

## **Abstract**

Tuberculosis is a contagious disease that affects one third of the world's population. In Mexico, the State of Baja California is the most affected with the highest rate of national incidence and mortality of 35.34 and 8.05 per 100,000 population, respectively. The purpose of this study was to determine *Mycobacterium tuberculosis* polymorphisms genetics found in Baja California in order to establish a relationship on its prevalence and/or endemism in this area. The genotypes of 43 strains of *M. tuberculosis* were analyzed by using MIRU4, MIRU40 and VNTR1955 (Mtub21), which demonstrated 16 patterns with a high genetic diversity. This is the first molecular study from *M. tuberculosis* strain of Baja California and shows their origin through a common strain based on their similarity.

**Keywords:** tuberculosis, tandem repeat DNA, molecular epidemiology.

## Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad contagiosa que es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mt). Actualmente un tercio de la población mundial (más de dos billones de gentes) están infectadas y en el año 2008 se estimó que murieron 1.3 millones de personas por este mal (1). La tuberculosis es una enfermedad de la pobreza y afecta principalmente a adultos jóvenes en sus años más productivos. La inmensa mayoría de muertes se reportan en los países en vías de desarrollo (1, 2, 3). América representa cerca del 3% de la tasa de incidencia global (1). México tiene una tasa de incidencia que oscila entre 2.35 a 35.34 por 100,000 habitantes, distribuidos en las treinta y dos entidades federativas, siendo Baja California el estado más afectado con la tasa de incidencia y mortalidad más alta (35.34 and 8.05 por 100,000 hab., respectivamente (4).

El análisis de huellas digitales es una herramienta muy útil para estudiar la epidemiología de la tuberculosis, indicando las posibles relaciones entre pacientes, origen de nuevos brotes, reinfecciones, patogenicidad, entre otras (5, 6). La genotipificación basada en el número variable de secuencias repetidas en serie (VNTRs) y las unidades repetitivas intergénicas de

micobacterias (MIRUs) han sido utilizadas para analizar los polimorfismos de 12 - 24 loci, donde el set de 12 es el más ampliamente utilizado (7, 8, 9). Este método de análisis está basado en la reacción en cadena de la polimerasa, la cual amplifica uno o varios locus, utilizando cebadores específicos que flanquean las regiones repetitivas. De tal forma que la determinación del tamaño del amplicón reflejara el número de repeticiones del MIRU o VNTR que se esté trabajando.

Este protocolo ofrece la ventaja de poder establecer de una forma rápida la estructura poblacional genómica de hasta un pequeño número de muestras, además puede ser utilizado junto con el espoligotipo (*spoligotyping: spacer oligonucleotide typing*) para determinar los tipos de cepas y su relación epidemiológica a nivel mundial. A pesar de ser muy útiles estos métodos el análisis de la secuencia de inserción IS6110 es también requerida para relacionar los grupos clonales (10, 11) sin embargo, llevar a cabo todos estos procedimientos es costoso. Es por ello que en este estudio se realizó solo la amplificación de 3 pares de MIRUs y VNTRs, estos locus fueron seleccionados en base a su alta frecuencia y polimorfismo en diferentes regiones geográficas, incluido Latino América (9). El propósito de este trabajo fue establecer los

polimorfismos de *M. tuberculosis* y su distribución geográfica en el estado de Baja California.

## **Materiales y métodos**

### **Muestras Clínicas**

Se aislaron 43 cepas de *M. tuberculosis* en el medio Lowestein Jensen a una temperatura de 37°C de muestras clínicas de pacientes provenientes de diferentes regiones de Baja California, las cuales fueron centralizadas en el Hospital General de la Ciudad de Tijuana, B.C., México. Las cepas fueron previamente identificadas mediante el uso de la tinción BAAR, pruebas bioquímicas y/o PCR (12) antes de ser utilizadas para el análisis genotípico por PCR. Los datos de los pacientes se obtuvieron del registro del mismo hospital y se omitió la información personal.

### **Extracción de DNA de *M. tuberculosis***

Las cepas de *M. tuberculosis* fueron inactivadas por el método de Bollet C. y colaboradores, (13), con ligeras modificaciones. Para la inactivación de las bacterias se tomó una asada del cultivo y se resuspendió en un microtubo de centrifuga con 200 µl de TE (1X: Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH 8), enseguida se adicionó un volumen de 50 µl de SDS al 10%. Los 250 µl totales

se sometieron a un calentamiento en un baño María por 5 minutos a 100°C, posteriormente, se realizó la extracción de ADN.

A cada muestras inactivada se le dieron tres choques térmicos en hielo seco etanol o acetona, durante 2 minutos de congelación y 2 minutos de descongelación en un baño de agua a 37°C, después la muestra fue incubada a 65 °C por 30 minutos. Posteriormente se le adicionó un volumen de fenol neutro, la mezcla se centrifugó a 13000 g por 5 minutos para separar la fase acuosa, la cual se depositó en un tubo limpio, a esta mezcla se le agregó un volumen de una mezcla de fenol: cloroformo 1:1, se agitó y se volvió a centrifugar a 13000 g por 5 minutos, se separó nuevamente la fase acuosa en un tubo limpio a la cual se le realizaron dos extracciones mas con un volumen de una mezcla de 24:1 Cloroformo: Alcohol Iso-Amilico. Finalmente se midió el volumen de la fase acuosa y se le agregaron 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol, la mezcla se incubó toda la noche a -20 °C. Al siguiente día la mezcla se centrifugó a 13000g por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 80%, se elimino el exceso de etanol del ADN precipitado y se seco durante 15 minutos a 37 °C, después el precipitado se resuspendió en 50 µL de agua libre de

DNAasas (reactivos de SIGMA, St. Louis Missouri, USA).

### PCR y MIRU-VNTR

Se llevaron a cabo las reacciones de PCR, utilizando la mezcla comercial Master mix de Promega a 1x (2x: 400  $\mu$ M c/u dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, amortiguador de PCR pH 8.5, 50 U/ml de Taq polimerasa), los cebadores utilizados fueron los ya previamente publicados (9):

MIRU4 (ETRD), sentido: 5'GTTGATCGAGGCCTATCACG3' y antisentido:

5'GAATAGGGCTTGGTCACGTA3', MIRU40, sentido:

5'GGTTGCTGGATGACAACGTGT3' y antisentido:

5'GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA3', VNTR1955 (Mtub21), sentido:

5'AGATCCCAGTTGTCGTCGTC3', antisentido:

5'CAACATCGCCTGGTTCTGTA3' a una concentración final de 1  $\mu$ M, en un

volumen total de 25  $\mu$ L, 1-2  $\mu$ L de ADN bacteriano. Se utilizo como control

negativo agua libre de ADN asas y como control positivo ADN de la cepa de *M.*

*tuberculosis* H37Rv. El termociclador (MultiGene mini thermal cycler, LABNET

International Inc ®) fue programado un ciclo de desnaturalización de 3 min a

94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 2 min a 72°C, más un ciclo de

extención por 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados con

luz uv en geles de agarosa 2.5% teñidos con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml), utilizando el amortiguador TAE (1x: 0.04 M Tris-Acetato, 001M EDTA) (14). Se utilizo el estándar de ADN de 100pb PROMEGA®.

### **Diversidad alelica y análisis**

La asignación de alelos estuvo basada en el patrón de migración de los productos de PCR y su longitud (pares de bases) correspondiente a la calculada teóricamente de acuerdo a lo establecido para cada locus; 77 pb para MIRU4, 54 pb para MIRU40 and 57 pb para VNTR1955, mas los nucleótidos extra que flanquean la secuencia de repetición y el tamaño de los cebadores. Los nombres de los alelos fueron los ya establecidos y numerados en orden ascendente. Se realizo una matriz de presencia-ausencia con el programa de computo Microsoft Excel 98 para después ser importada por el programa PRIMER v6 (15), donde se calculo el Índice de similitud de Jaccard y se obtuvo el dendograma.

Se calculo la diversidad alelica para cada locus mediante el uso de las siguientes formulas: Índice de diversidad de Shannon (H') y diversidad máxima:

$$H' = \sum_{j=1}^s p_i * \ln (p_i)$$

$$H'_{max} = \ln(S)$$

Donde  $s$  es el número total de patrones diferentes de MIRU-VNTR,  $p_i$  es la frecuencia relativa del  $i$ th patrón.

Se calculo además el Índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) de cada locus, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$HGDI = 1 - \left[ \frac{1}{N(N-1)} \right] \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

$N$  es el número total de cepas de un esquema dado,  $s$  es el número total de patrones diferentes de MIRU-VNTR,  $n_j$  es el número de cepas que pertenecen al patrón  $j$ th.

El índice de Pielou fue calculado con la siguiente fórmula:

$$J' = \frac{H'}{H'_{max}}$$

## Resultados

Se analizo el genotipo de un total de 43 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes de Baja California, México, de los años de 2002, 2003 y 2005, las cuales estuvieron representadas por el 59% de muestras de expectoración, 33% no se especifico, 2.5% de liquido pleural y 5% de ganglios. Solo al 31% de ellas se le determino la susceptibilidad a antibióticos, 13% de estas

muestras pertenecían a pacientes reincidentes. El sexo más afectado fue el hombre siendo de un 85%. La edad de los pacientes fluctuó de los 15 a 58 años.

Los alotipos encontrados con el marcador molecular MIRU 4 (ETRD) fueron 3, representados por su patrón de migración en el gel de agarosa, siendo de 638 pb (77x3 (+7 copias), 715 pb (4 copias) y 862 (6 copias). El alotipo que tuvo mayor frecuencia fue el primero, representado por el 83% de las muestras, mientras que los demás estuvieron en 14 y 3%, respectivamente.

Para el análisis de alotipos utilizando el marcador molecular MIRU 40, se encontraron 4 alotipos, representados por su migración en el gel de agarosa de 408 pb (54x1 copias), 444 pb (54x2 copias), 500 pb (54x3 copias), 552 pb (54x4 copias). El alelo de mayor frecuencia fue el de 3 copias (46%) seguido del de 2 (31%), 4 (14%) y 1 (9%) copias. Para el marcador VNTR1955 (Mtub21) se encontraron 5 alotipos de 173 pb (57x1 copia), 205 pb (57 x1, +34), 287 pb (57x3 copias), 344pb (57x4) y sin ninguna copia, representados con una frecuencia de 14, 37, 26, 2% y 21%, respectivamente (Figura 1).

El análisis discriminatorio de Hunter-Gaston para cada locus analizado fue de 0.14 para MIRU4, 0.64 para MIRU40 y 0.7 para VNTR1955. Sin embargo, para

la combinación de los tres locus el índice arrojó un valor de 0.83.

La relación genética entre las muestras fue analizada con los tres marcadores utilizando el Índice de similitud de Jaccard y el algoritmo de la distancia del vecino más cercano, ambos análisis mostraron dos grupos, uno con la mayoría de las muestras, con una similitud cercana al 50% de similitud, el cual contiene el alotipo más frecuente de MIRU4 y el otro grupo representado con los alotipos de menor frecuencia (Figura 2). La combinación de los tres marcadores arrojó 16 patrones, con un Índice de diversidad de Shannon de 2.18 y un valor de equitatividad de Pielou de 0.87.

## **Discusión**

El estudio de huellas digitales utilizando MIRUs-VNTRs es una herramienta muy valiosa en los estudios epidemiológicos de tuberculosis y en México se ha iniciado este tipo de análisis. Aun cuando se ha adoptado ampliamente el uso de 12 loci en combinación con el espoligotipo para relacionar patogenicidad, origen y variabilidad genética, existen trabajos que utilizan un locus como por ejemplo MIRU24 o MIRU4 para relacionar la heterogeneidad clonal y policlonal (16, 17, 18). Los tres marcadores en este trabajo fueron seleccionados en base a su alta frecuencia en Latino América y por tener un alto polimorfismo, así

como lo reporta Supply y colaboradores (19), quienes encontraron para MIRU4 un total de 9 alelos, para MIRU40, 7 alelos y para VNTR1955, 10 alelos, el cual es el máximo obtenido con éxito en amplificación. Cabe señalar que en un inicio se escogieron 6 juegos de marcadores sin embargo, los aquí reportados fueron los que presentaron una buena amplificación, así podemos demostrar que se obtuvieron tres alelos para MIRU4 (3, 4 y 6 copias), cuatro alelos (1-4 copias) para MIRU40 and cinco alelos (0-4 copias) para VNTR1955. Por otro lado, el número de copias para el marcador MIRU4 fue diferente en este estudio al reportado en otras regiones de Norte América, Canadá y Latino América (2-3 copias) (19). Así como también a lo reportado en pacientes con HIV de la ciudad de México, quienes presentan de una a tres copias (20). Para MIRU40, el número de copias fue igual al reportado por Supply et al. (19) para Latino América (1-4 copias), pero diferente al estudio de López-Álvarez (0-5 copias) (20). En cuanto al marcador VNTR1955, el cual no es utilizado entre el juego de 12 marcadores, el número de copias de este locus se encuentra en el rango establecido por Supply et al. (19) para Latino América.

El conjunto de los tres marcadores utilizados en este trabajo arrojó 14 patrones diferentes, con una diversidad de Shannon relativamente alta, al igual que el

reportado en cepas de *M. tuberculosis* en el estado de Michoacán (21), aunque ellos utilizaron tres cebadores RAPDs (polimorfismo al azar de DNA amplificado). Cabe señalar que el análisis discriminatorio de Hunter-Gaston basado en el Índice de diversidad de Simpson para cada locus generalmente da valores bajos (por ejemplo 0.06-0.6) (22), pero cuando se analiza el conjunto de loci, mejora notablemente, como lo encontrado en este estudio, aunque también por ello se recomiendan 9 locus, para un análisis más fino (19).

Baja California es el estado mexicano con la tasa de incidencia y mortalidad más alta de tuberculosis, cuenta además con dos regiones de agricultura (valle de Mexicali y valle de San Quintín), en la cual se contratan trabajadores temporales que provienen de zonas con alta pobreza del sur del País, estos trabajadores se movilizan por temporadas de cosecha entre diferentes estados, principalmente del noroeste de México. Esta población flotante es de las más afectadas por esta enfermedad, de tal forma que uno de los objetivos de este trabajo fue establecer la distribución de genotipos en diferentes localidades del estado sin embargo, no se pudo observar, debido a la alta similitud entre los genotipos, lo cual nos hace pensar que *M. tuberculosis* pertenece a una misma

población clonal y se ha diversificado con el tiempo. Otra de las preguntas por resolver fue determinar la relación de genotipos con el origen de los pacientes a fin de demostrar cual genotipo era el predominante en personas de residencia permanente en Baja California, con respecto a la población flotante no obstante, no se pudo determinar debido a que el historial del paciente solo muestra el lugar de donde se colecto la muestra.

Desafortunadamente la tuberculosis es una enfermedad que está asociada con la pobreza y con una baja calidad de vida (1), tal como lo podemos ver en la población migrante agrícola de Baja California, quizás este es uno de los factores más importantes de estar contrayendo la enfermedad, así como también lo es, el no llevar el tratamiento de una forma adecuada, de tal forma que ellos siguen siendo el foco de infección.

Este trabajo contribuye de una forma inicial con el estudio de los genotipos de cepas de M. tuberculosis en Baja California y se espera en un futuro llevar a cabo un análisis mas completo utilizando el juego de 12 marcadores y el espoligotipo.

## **Reconocimientos**

Este estudio fue parcialmente financiado por PROMEP en su programa de apoyo a nuevos profesores de tiempo completo, periodo 2009. Además, formo parte de una tesis de maestría en Epidemiología en salud pública.

## Referencias

1. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report.
2. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 658–685.
3. Snowden FM. Emerging and reemerging diseases: a historical perspective. *Immunol* 2008; Rev. 225: 9-26.
4. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CENAVE). Magnitud y trascendencia de la tuberculosis en México. (<http://www.cenave.gob.mx/>).
5. van Deutekom H, Supply P, de Haas PEW, Willery E, Hoijing SP, Locht C, Coutinho RA, and van Soolingen D. Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a More Accurate Method for Identifying Epidemiological Links between Patients with Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4473–4479

6. Alonso M, Borrell S, Martínez-Lirola M. A proposal for applying molecular markers as an aid to identifying potential cases of imported tuberculosis in immigrant. *Tuberculosis* 2008; 88(6): 641-7.
7. Frothingham R and Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiol* 1998; 144:1189-1196
8. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B and Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36:762–771.
9. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D and Locht C. Automated high-Throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium* interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3563-3571.
10. Cardoso-Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rüsç-Gerdes S, Locht C, Niemann S and Supply P. Assessment of an optimized *Mycobacterial* Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-

- Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. Amer J Clin Microbiol 2007; 3 (45): 691-697.
11. Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M. Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. J Clin Microbiol 2006; 6 (44): 1951-1962.
12. Landeros-Sánchez B, Muñoz Márquez ME, Hernández-Guevara E, Maya-Campos F. PCR, RFLP y Secuenciación del gen plcA-mtp40 de *Mycobacterium tuberculosis*, en aislamientos clínicos de pacientes ambulatorios con tuberculosis activa en Tijuana, B.C. México. NOTICONAQUIC 2008; 16(44): 28-44
13. Bollet C, Gevaudan MJ, Lamballerie X de, Zandotti C and Micco P de. A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria. Nucleic Acids Res 1991; 19 (8): 1955.

14. Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. (2002). Short protocols in molecular biology, Fifth edition, John Wiley & Sons Inc.
15. Clarke KR and Gorley RN. Primer v6 User manual/Tutorial PRIMER-E, Plymouth. 2006.
16. Martín A, Herránz M, Ruiz Serrano MJ, Bouza E and García de Viedma D. Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. BMC Microbiol 2007; 7:73.
17. García de Viedma D, Alonso-Rodríguez N, Andrés S., Ruíz-Serrano MaJ, Boaza E. Characterization of Clonal Complexity in Tuberculosis by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing. Amer. Soc. For Microbiology. 2005; 11 (43):5660-5664.
18. Djelouadji Z, Raoult D, Daffe´ M, Drancourt M. A Single-Step Sequencing Method for the Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Species. Plos Neglected Trop Dis 2008; 2(6): e253
19. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Hass P, van Deutekom, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC,

- Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C and van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006; 44 (12): 4498-4510.
20. López-Álvarez R, Badillo-López C, Cerna-Cortes JF, Castillo-Ramírez I, Rivera-Gutiérrez S, Helguera-Repetto AC, Aguilar D, Hernández-Pando R, Samper S, González-y-Merchand JA. First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. BMC Microbiol 2010; 10:82, 1471-2180.
21. Vázquez-Marrufo G., Marin-Hernández D., Zavala-Paramo MG., Vázquez-Narvaez G., Alvarez-Aguilar C., Vazquez-Garcidueñas MS., Genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexican patients. Can J Microbiol 2008; 8 (54): 610-618.
22. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SMM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG and Neill SD. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiol 2002; 148: 519-528.

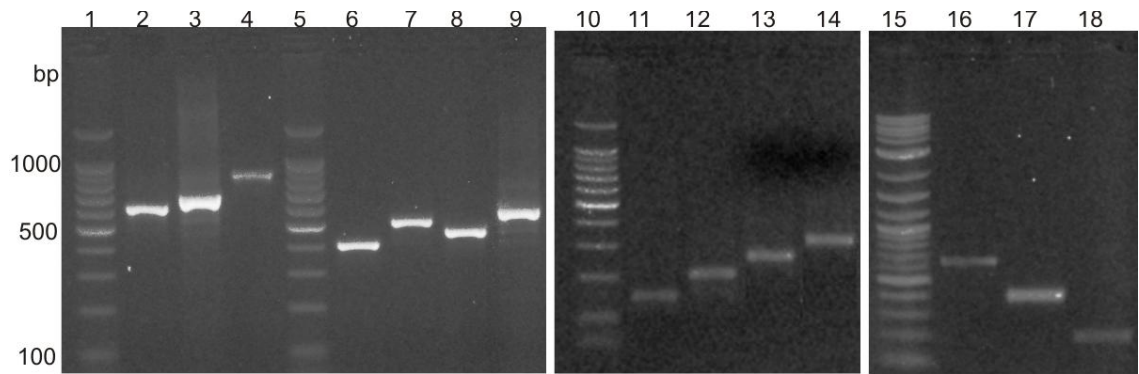


Figura 1. Gel de electroforesis en agarosa que muestra los alelos de MIRUs-VNTR1955 de *Mycobacterium tuberculosis* amplificados por PCR. Carriles 2-4) MIRU4, 6-9) MIRU40, 11-14) VNTR1955, 16) control + cepa H37Rv MIRU4, 17) H37Rv MIRU40, 18) H37Rv VNTR1955, 1, 5, 10, 15) escalera de ADN de 100pb.

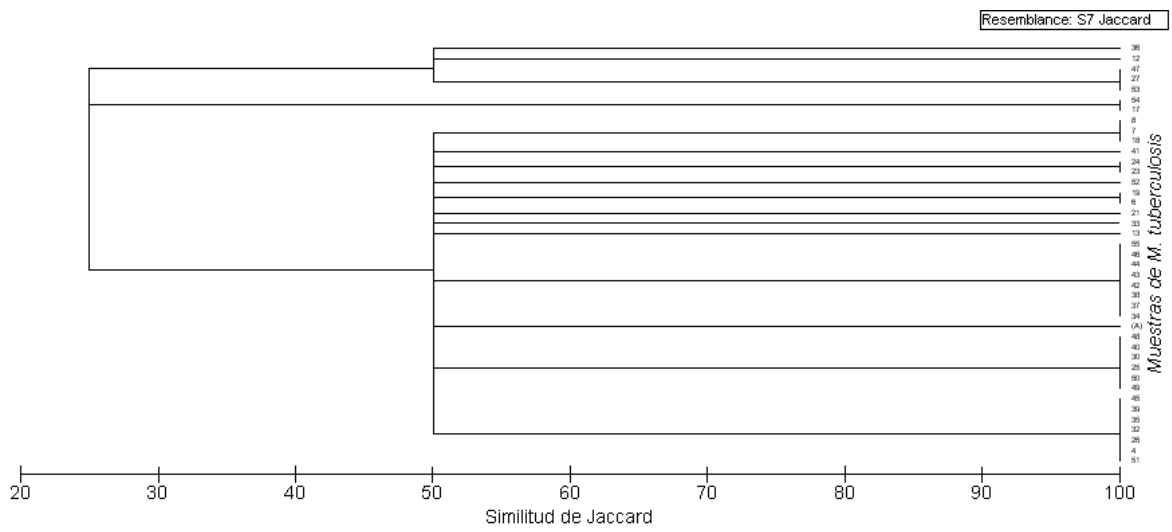


Figura 2. Dendograma que muestra la similitud de las muestras en base a los alelos encontrados de cada MIRUs-VNTR de *M. tuberculosis*.

### **3.2 El metabolismo de hierro en la respuesta inmune innata.**

**The metabolism of iron in the innate immune response.**

Bertha Landeros Sánchez, Tomas Rentería Evangelista, Gerardo Medina

Basulto, Sawako Hori-Oshima

## **Introducción.**

La respuesta inmune innata sirve como primera línea de defensa contra patógenos e incluye barreras naturales como es la piel, mucosa y el ácido gástrico y componentes de células inmunológicas como los monocitos, neutrófilos y células dendríticas las cuales se activan rápidamente para controlar el crecimiento del patógeno y promover la inflamación y posteriormente el desarrollo de la inmunidad adaptativa (1). La identificación inicial de los patógenos está dada por la interacción de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) con ligandos específicos de los patógenos como peptidoglicano, lipopolisacáridos, flagelina y ARN de doble cadena, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o productos de células dañadas del hospedero conocidas como patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs). Los PRRs se clasifican en dos categorías: sensores y fagocíticos que se basan en la activación de cascadas de señales proinflamatorias o en la fagocitosis de patógenos, respectivamente (2). Estas rutas de inmunidad innata inducen varios mecanismos antimicrobianos incluyendo la reducción de hierro disponible para patógenos a nivel celular y sistémico.

El hierro es un elemento esencial para casi todos los organismos vivos y debido a su alta capacidad de fungir como donador-aceptor de electrones está asociado con representantes de heme que involucra un gran grupo de eventos metabólicos y funciones proteicas en nuestro cuerpo, por ejemplo en el transporte de oxígeno de la hemoglobina, en el almacenamiento de oxígeno, en la mioglobina, en el transporte de electrones y para la función de los citocromos en la respiración aeróbica.

A pesar de la gran utilidad de hierro en el cuerpo, el exceso de hierro causa daño, principalmente por su alta reactividad con oxígeno, produciendo radicales libres, y aumenta el estrés celular. La homeostasis de hierro balancea la necesidad de hierro y por lo tanto limita la toxicidad asociada con la absorción, utilización y almacenamiento de metales. Estos roles fisiológicos implican reacciones de intercambio, de captura y donación de electrones entre los iones ferrico y ferroso. Las enfermedades causadas por deficiencia de hierro son las anemias, la enfermedad de Crohn, y enfermedades hereditarias como la hemocromatosis por exceso de hierro.

## Homeostasis de hierro

El cuerpo humano necesita hierro para llevar a cabo el transporte de oxígeno, el hierro es un elemento esencial para la vida. El organismo tiene desarrollado un alto grado de conservación de hierro cuando este no es eliminado del cuerpo, más que regular la cantidad de hierro en el sistema, el organismo regula la entrada de hierro de la dieta.

El hierro entra en el organismo uniéndose a transferrina y posteriormente es liberado por la circulación portal del hígado. Ningún exceso de hierro no heme puede ser almacenado en la ferritina del hígado y el hierro circulante se une a la transferrina. La transferrina se une a la célula por receptores de superficie celular y es internalizada por endocitosis mediada por receptor, en donde la acción del pH ácido mediado por las enzimas hidrolíticas libera el hierro unido a la transferrina. Este mecanismo libera hierro al tejido periférico (3).

Es necesario que el hierro se libere de la ferritina para cubrir las demandas de hierro en el transporte de oxígeno y metabolismo. La ferritina circulante dona hierro a la célula por medio de un receptor, también por distribución de hierro en sitios de almacén de tejido periférico como por ejemplo, músculo y médula ósea (4).

El sitio dominante para la utilización de hierro es la médula ósea, necesario en la hemoglobinización de las células rojas. El cuerpo tiene un reservorio de hierro en los eritrocitos de cerca de 20-25 mg que son reciclados cada día en la eritrofagocitosis de las células rojas de la sangre por macrófagos en el riñón y sistema retículoendotelial. Esta liberación de hierro puede ser reciclada y también utilizada o almacenada, la captura de hierro de la dieta diaria está limitada con únicamente 1-2 mg/día. Este es un mecanismo muy complejo y sensible que responde a la saturación de la unión de hierro por transferrina y otros mecanismos regulatorios incluyendo infección e inflamación, esto ayuda a controlar el metabolismo de hierro para limitar el exceso y prevenir su deficiencia (5).

La captura de hierro en el epitelio intestinal involucra el transportador de metales divalentes 1 (DMT1). En la salida del hierro a través de los enterocitos hacia la circulación, esta involucrada una proteína llamada ferroportina. Cuando la cantidad de hierro en el cuerpo es baja por pérdida de sangre por ejemplo, la absorción de hierro de la dieta se incrementa primeramente por la acción de la regulación de estas dos proteínas con asociación de enzimas con actividad oxidoreductasas, las cuales ayudan a transportar el hierro en su forma férrica o ferrosa.

### **Ferroportina.**

La ferroportina también conocida como Slc40a1, MTP1 O Ireg1 es el único miembro de la familia SLC40 de transportadores de hierro (6), es una proteína de transmembrana localizada en, macrófagos, enterocitos del duodeno, hepatocitos, células tubulares del riñón: Aunque también se ha localizado en los eritrocitos, su función en estas células no es clara (7). El hierro sale unido a la ferroportina, que se deberá convertir de ferroso a férrico que es menos perjudicial para la célula (8). La ferroportina es la única proteína conocida que transporta el hierro desde el interior del citoplasma de la célula hacia el plasma (9). La actividad de transporte de metal no ha sido aun bien estudiada aunque existe la evidencia de la actividad de transporte de fierro, aunque también puede transportar otros metales esta actividad es menos eficiente porque tiene una baja afinidad para otros metales (10). La ferroportina es una proteína con los dominios amino y carboxilo terminal en el citosol. La proteína funciona como un monómero o un oligómero, contiene 12 dominios transmembrana (11). Aunque se tiene evidencia de que su estructura es multimerica, por lo que también se considera que la ferroportina se comporte como un dímero (12).

La regulación de la ferroportina a nivel transcripcional y traduccional se lleva acabo por el hierro presente (13). La expresión aumenta más por una sobrecarga que por una deficiencia en macrófagos de pulmón y bazo, lo que causa una baja expresión en macrófagos de ratón con inflamación aguda. Este mecanismo no esta bien estudiado, pero se cree que la hepcidina podría estar involucrada como regulador de la inflamación aguda (14,15,16).

En la región 5'UTR no traducible de la ferroportina se localizan regiones muy conservadas llamadas IRE lo que indica su importancia en este mecanismo

regulatorio. Esta región IRE se une a proteínas represoras llamadas IRP1 e IRP2 (17). La acción de unión del IRE de ferroportina a las proteínas represoras es para regular la traducción, aunque no se conoce con detalle la cantidad de hierro que es necesaria para la regulación de la proteína a nivel transcripcional o traduccional .

## **Hepcidina**

Una de las proteínas de mayor importancia en la homeostasis del hierro es la hepcidina, fue descrita por primera vez como LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide 1) en el año 2000 y posteriormente un año más tarde se correlacionó esta proteína en el metabolismo del hierro junto a otros genes y proteínas, lo que ha permitido definir la sobrecarga de hierro por su déficit y la anemia inflamatoria por su exceso. Esta proteína tiene propiedades antimicrobianas y antifúngicas *in vitro*. La hepcidina es una hormona, péptido producido en el hígado en respuesta a la acumulación de hierro (18), por lo que la función de la proteína es la de regular la cantidad de hierro presente en los organismos eucariotas que fue descubierto por su función principal en el mantenimiento de homeóstasis de hierro intracelular en humanos y otros mamíferos. El gen que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 19, codifica un pro péptido de 84 aminoácidos del que por acción enzimática derivan las formas activas C-terminal con 20, 22 y 25 aminoácidos que contiene 6 cisteínas, lo cual resulta con un gran número de enlaces disulfuro. La hepcidina es miembro de la familia de las defensinas, es la única que es elaborada por los hepatocitos, las otras defensinas se elaboran en las células epiteliales y es altamente conservada en todos los vertebrados (19).

## **Regulación de hierro en defensa contra la infección**

La activación de fagocitos y de las células derivadas de TH-1 vía PRRs, tiene como consecuencia la disminución de la expresión de receptores de transferrina y expresión de la proteína Nramp1 y ferroportina (20,21,22,23). La ruta de mayor liberación de hierro hacia el tejido periférico es por medio del receptor de transferrina cuando es endocitado, el hierro se despegue de la proteína y es liberado hacia el plasma. La disminución de la regulación del

receptor de transferrina limita la habilidad de la célula para adquirir el hierro unido a la transferrina y reducir el hierro disponible para patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*, *M. avium* y *L. pneumophila* para restringir su crecimiento (24,25,26,27).

Nramp 1 es una proteína transportadora de metales divalentes dependientes de pH que se localiza en los compartimentos del fagosoma y reduce el hierro intrafagosomal(28). La proteína funcional confiere resistencia a parásitos intrafagosomales incluyendo *M. bovis BCG*, *L. donovani* y *Salmonella typhimurium*, aunque los parásitos se escapan para el citosol como *L. monocytogenes* no es afectada por el estado de Nramp1 (28,29).

En trabajos recientes se ha demostrado que hay supresión de la expresión de la IL-10 por la movilización de hierro por Nramp1 por lo que aumenta la producción de iNOS por los macrófagos para inhibir el crecimiento microbiano (30,31,32).

En caso especial por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, según los estudios realizados por nuestro grupo de investigación, se observó que el patógeno tiene una función importante para modular la respuesta inmune y la disponibilidad de hierro en las células mediante la regulación de expresión de la ferroportina (no publicado).

## **Conclusiones**

El hierro es esencial para el metabolismo de los seres vivos y, por lo tanto es importante mantener el nivel de hierro permitiendo al hospedador llevar a cabo una óptima respuesta inmune sin facilitar la disponibilidad de hierro a microbios patógenos. Se han reportado varias moléculas reguladoras del metabolismo del hierro como hepcidina, ferroportina y Nramp1, y sus respuestas en la competencia por hierro entre hospedador y patógeno durante la infección.

## **Bibliografía.**

1.- S.C. Eisenbarth, R.A. Flavell, (2009) Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome, *EMBO Mol. Med.* 1, 92-98.

- 2.- S. Khare, N. Luc, A. Dorfleutner, C. Stehlik, (2010) . Inflammasomes and their activation, *Crit. Rev. Immunol.* 30 463-487.
- 3.- J. Wang, K. Pantopoulos, (2011). Regulation of cellular iron metabolism, *Biochem. J.* 434, 365-381
- 4.- E.C. Theil, (2011). Iron homeostasis and nutritional iron deficiency, *J. Nutr.* 141, 724-728.
- 5.- T. Ganz. (2011). Heparin and iron regulation, 10 years Later, *Blood* 117, 4425-4433.
- 6.- Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA (2009). A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab* 9(5):461–73.
- 7.- Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C.(1992). Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med.* Mar-Apr; 7(2):145-53.
- 8.- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, (2005).The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.*;1:191–200.
- 9.- De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, et al. (2007) Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *Embo J* 26(12):2823–31.
- 10.- Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA (2009) A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab* 9(5):461–73.
- 11.- De Domenico, Ivana McVey Ward, Diane Charles Langelier, B. Vaughn, Michael, Nemeth Elizabetha, I. Sundquist Wesley, Ganz, Giovanni Musci Tomas,

and Jerry Kaplan.(2007). The molecular mechanism of hepcidin mediated ferroportin down-regulation. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 2569–2578.

12.- Sow, F.B., et al., (2007). Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4): 934-945.

13.-Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A,Vaulont S, (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2(USF2) knockout mice. *Proc. Natl.Acad Sci, USA*, 98:8780-8785.

14.-Park CH,Valore EV,Waring AJ, Ganzt (2000). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806-7810.

15.- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, loreal O (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276:7811-7819.

16.- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ.(2000). A novel duodenal iron regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* 5:299-309.

17.- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.*; 276:7811–9.

18.- De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM, Phillips JD, Ajioka RS,Kay MS, Kushner JP, Ganz T, Ward DM, Kaplan J. (2008). The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab*, 8:146–56.

19.- T.F. Byrd, M.A. Horwitz, (1989) Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular

multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron, J. Clin. Invest. 83, 1457-1465.

20.- T.F. Byrd, M.A. Horwitz, (1993). Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and down regulation by interferon gamma, J. Clin. Invest. 91, 969-976.

21,- M. Ter-Koltunoff, S. Goren, J. Noursbeck, C.G. Feng, A. Sher, K. Ozato, A. Azriel, B.Z. Levi, (2008). Innate immunity to intraphagosomal pathogens is mediated by interferon regulatory factor 8 (IRF-8) that stimulates the expression of macrophage-specific Nramp1 through antagonizing repression by c-Myc, J. Biol. Chem. 283, 2724-2733.

22,- M. Nairz, G. Fritsche, P. Brunner, H. Talasz, K. Hantke, G. Weiss, (2008). Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*, Eur. J. Immunol. 38, 1923-1936.

23.- T.F. Byrd, M.A. Horwitz, (1989). Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron, J. Clin. Invest. 83 1457-1465.

24.- T.F. Byrd, M.A. Horwitz, (1993). Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma, J. Clin. Invest. 91, 969-976.

25.- D.L. Clemens, M.A. Horwitz, (1996). The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin, J. Exp. Med. 184 1349-1355.

26.- O. Halaas, M. Steigedal, M. Haug, J.A. Awuh, L. Ryan, A. Brech, S. Sato, H. Husebye, G.A. Cangelosi, S. Akira, R.K. Strong, T. Espevik, T. H. Flo, (2010). Intracellular *Mycobacterium avium* intersect transferrin in the Rab11(b)

recycling endocytic pathway and avoid lipocalin 2 trafficking to the lysosomal pathway, *J. Infect. Dis.* 201, 783-792.

27.- M.F. Cellier, P. Courville, C. Champion, (2007). Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense, *Microb. Infect.* 9, 1662-1670.

28.- J.R. Forbes, P. Gros, (2001). Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions, *Trends Microbiol.* 9 397-403.

29.- M. Nairz, G. Fritsche, P. Brunner, H. Talasz, K. Hantke, G. Weiss, (2008). Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*, *Eur. J. Immunol.* 38, 1923-1936.

30.- M. Nairz, I. Theurl, S. Ludwiczek, M. Theurl, S.M. Mair, G. Fritsche, G. Weiss, (2007). The co-ordinated regulation of iron homeostasis in murine macrophages limits the availability of iron for intracellular *Salmonella typhimurium*, *Cell Microbiol.* 9, 2126-2140.

31.- M. Nairz, G. Fritsche, M.L. Crouch, H.C. Barton, F.C. Fang, G. Weiss, (2009). Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition, *Cell Microbiol.* 11 1365-1381).

32.- Andrew T. Mckie, David J. Barlow, (2004). The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1).*Eur J. Physiol*, 447:801-806.

## **CAPITULO 4**

---

### **Conclusiones**

## CONCLUSIONES GENERALES

La MAP se destaca entre los patógenos del género *Mycobacterium* por su habilidad de persistir dentro del hospedador durante un periodo de tiempo indefinido. Usualmente persiste en rumiantes por 2-5 años antes del desarrollo de la enfermedad clínica. Al igual que *M. tuberculosis*, una vez que entra al macrófago la MAP es capaz de persistir y replicarse en el fagosoma mediante el bloqueo de la fusión de fagosoma-lisosoma. La inmunidad innata representada principalmente por las respuestas tempranas de macrófagos dirige la inmunidad adaptativa, influyendo a la progresión y la consecuencia de la enfermedad. Por lo anterior, es de suma importancia aclarar las interacciones entre la MAP y macrófago en etapa temprana de la infección. El presente estudio muestra claramente que el antígeno de la MAP puede modular la regulación del metabolismo de hierro del hospedador mediante la ferroportina. Por otro lado, los estudios comparativos en un futuro, utilizando diferentes antígenos de *M.tuberculosis* nos facilitará identificar mecanismos únicos del MAP para la modulación del metabolismo de hierro del hospedador. El tema clásico del estudio de la MAP, la dependencia al hierro, se juntó con las técnicas moleculares para abrir una nueva línea de investigación sobre mecanismos moleculares de la adaptación y la sobrevivencia de la MAP en el hospedador, con un gran potencial en el desarrollo de técnicas diagnósticas y nuevos blancos de farmacoterapias.



