



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA  
CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E  
INGENIERÍA**

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**"MAP3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, inhibe  
la expresión de MCP-1 de macrófagos J774A.1".**

**T E S I S**

Que presenta

**Raul Eduardo Celis Zamora**

Para obtener el grado de

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Director de tesis

**Dra. Bertha Landeros Sánchez**

Tijuana, Baja California

Abril 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**  
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

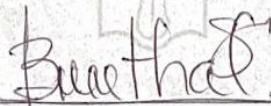
**FOLIO No. 071**

Tijuana, Baja California, a 31 de marzo de 2025

**C. RAUL EDUARDO CELIS ZAMORA**  
PASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO  
PRESENTE:

El tema de trabajo para su examen profesional, en la opción de **Tesis**, propuesto por la **Dra. Bertha Landeros Sánchez**, quien será la responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema: "**MAP3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, inhibe la expresión de MCP-1 de macrófagos J774A.1**", el cual usted deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

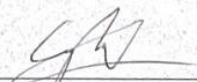
- I. RESUMEN
- II. ABSTRACT
- III. INTRODUCCIÓN
- IV. OBJETIVOS Y META
- V. MATERIALES Y MÉTODOS
- VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VII. CONCLUSIONES
- VIII. BIBLIOGRAFÍA



Dra. Bertha Landeros Sánchez  
**Directora de Tesis**



M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez  
**Director**



Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez  
**Subdirectora**

*“Se como el pájaro que, deteniendo su vuelo un rato en ramas demasiado débiles, siente cómo ceden bajo su peso, y sin embargo canta, sabiendo que tiene alas”.*

**Víctor Hugo (1802-1885)**

## Dedicatoria

*A todos los animales de experimentación. El camino es largo y en constante evolución, así que debemos siempre acordarnos que usar animales en investigación es un privilegio que la sociedad brinda a la comunidad científica con la expectativa de que tal uso proveerá nuevos conocimientos o un estado de mejor bienestar de hombres y de animales.*

## **Agradecimientos**

Al mundo en su totalidad, por permitirme crecer y darme cuenta de los aspectos sociales, económicos y científicos, por lograr encontrar un camino que seguir y cuidar.

A la literatura científica que acrecentó en mí, informarme y actualizarme en aspectos científicos y académicos para crecer en una carrera científica.

Gracias a los docentes que integran la carrera de químico farmacéutico biólogo con sus enseñanzas, experiencias académicas y profesionales logré tener conciencia en realizar una tesis durante mi licenciatura.

Gracias integras a la Dra. Bertha por haberme permitido desarrollar mi proyecto de tesis de licenciatura en su laboratorio, por su increíble enseñanza, por su confianza, por su forma de ver al mundo y el mundo de la inmunología. Por sus enseñanzas y paciencia. Por su apoyo y excelente asesoría.

A la Dra. Dulce y Dra. Jocelyn, por su apoyo en el laboratorio de biología Molecular, gracias a su conocimiento y atención.

A los estudiantes egresados del laboratorio de Biología Molecular, que integraron el laboratorio de Biología Molecular de la Dra. Bertha. Con ellos pude lograr entender mejor el proyecto de investigación actual.

A la Dra. Lilia, Dr. Hoffmann y Dr. Ramos. Por su increíble conocimiento en Microbiología y Biología Molecular, me dio un motivo significativo en seguir mi aprendizaje en ciencias biológicas.

A mis Padres y hermano por ser conscientes de mi trabajo académico, por apoyarme en cada paso doy en mi vida, aunque eso haya implicado alejarme de casa.

A Katheryn, Por todo el amor, la bondad, gentileza, compromiso y paciencia que implica hacer investigación académica, en todo momento. Por su cariño y lealtad incondicional que me ayudo a seguir adelante en cada etapa durante este proceso.

A la FUABC y Universidad de la Coruña, por permitirme realizar un intercambio estudiantil y además realizar una estancia de investigación en donde recibí valioso conocimiento.

A Cinvestav, por haberme brindado un nuevo camino en la investigación y aplicar los conocimientos adquiridos para realizar esta tesis.

A la UABC y FCQI, por proveerme las herramientas necesarias para mi formación y por el financiamiento para asistir al Congreso Nacional de Inmunología 2023 durante mi licenciatura, que me permitió continuar con mi tesis y estudios de licenciatura.

Por ultimo, un profundo agradecimiento a la Maestra Alejandra Ramírez Zavala, por haber inculcado en mi el amor hacia la lectura, escritura y literatura que pueda existir.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
INDICE DE TABLAS .....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN .....	11
1. <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> .....	11
1.1. Clasificación taxonómica de MAP .....	12
1.1.2. Diversidad de cepas MAP .....	13
1.2. Paratuberculosis.....	14
1.2.1. Enfermedad de Crohn.....	16
1.2.2. Susceptibilidad a la infección por MAP .....	19
1.2.3. Transmisión de MAP .....	20
1.2.4. Signos clínicos de PTB.....	20
1.2.5. Prevalencia y distribución de paratuberculosis en pequeños rumiantes. ...	21
II. ANTECEDENTES .....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	43
IV. HIPOTESIS .....	44
V. OBJETIVOS GENERALES.....	44
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
VII. MATERIALES Y METODOS .....	46
VIII. RESULTADOS.....	55
IX. DISCUSIÓN .....	61
X. CONCLUSIÓN.....	67
XI. BIBLIOGRAFIA.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Micrografía electrónica de barrido que muestra la capa gruesa y cerosa de Mycobacterium avium paratuberculosis. Cortesía de Johne's Testing Center, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Wisconsin (Wisconsin, EE. UU.) [44].....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2. Tinción de Ziehl-Neelsen del íleon terminal de una vaca que muestra la naturaleza acidorresistente de Mycobacterium avium paratuberculosis. Cortesía de Johne's Testing Center, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Wisconsin (Wisconsin, USA) [44] .....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 3. Una ilustración de la diferenciación de cepas MAP basada en el análisis filogenético, basado en SNP del genoma completo [14].....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 4. Causas de la enfermedad de Crohn [45].....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 5. Estatus internacional de Paratuberculosis (organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2019) .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6. Absorción de MAP ingerida por vía oral .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 7. Mapa del plásmido pcDNA 3.1 de invitrogen TM .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación del inserto del gen MAP3773c, con el tamaño esperado de aproximadamente 420pb. Carriles de izquierda a derecha. Carril 1. Marcador de peso molecular, Carril 2 y 3 digestiones pcDNA3.1-MAP3773c, carril 4 y 5 pcDNA 3.1 sin digerir. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 9. Resultados de ANOVA .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 10. Curva estandar de Mouse MCP-1 Platinum ELISA.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 11. Gráfica de barras de Mouse MCP-1 Platinum ELISA 24 hrs. <math>p \leq 0,05</math>. Resultados de izquierda a derecha controles/tratamientos 1. J774A.1 basal 2. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] 3. J774A.1 transfectadas sin pcDNA 3.1 + neomicina [400 mg/mL] 4. J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL] 5. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM]. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 12. Grafica de barras de Mouse MCP-1 Platinum ELISA 48 hrs. Datos tratados y obtenidos mediante Excel 2021. <math>p \leq 0,05</math>. Resultados de izquierda a derecha controles/tratamientos 1. J774A.1 basal 2. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] 3. J774A.1 transfectadas sin pcDNA 3.1 + neomicina [400 mg/mL] 4. J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL] 5. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM]. ....</b>	<b>59</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Mezcla de reactivos de la digestión enzimática.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 2. Concentraciones de plásmidos purificados. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 3. Concentraciones y absorbancias de la curva estándar Mouse MCP-1 Platinum ELISA.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 4. Resultados de Mouse MCP-1 Platinum ELISA. Condiciones de los tratamientos, tipo de tratamientos y concentraciones finales de los experimentos realizados durante 24 horas. Datos sobre la concentración de los sobrenadantes de MPC-1 a 24 horas (en pg/mL):.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 5. Resultados de Mouse MCP-1 Platinum ELISA. Condiciones de los tratamientos, tipo de tratamientos y concentraciones de MCP-1 finales de los experimentos realizados durante 48 horas. Datos sobre la concentración de los sobrenadantes de MCP-1 a 48 horas (en pg/mL):.....</b>	<b>60</b>

## RESUMEN

Paratuberculosis (MAP) es un agente causal de la enfermedad intestinal granulomatosa crónica en animales y se asocia con diversas enfermedades autoinmunes en humanos, como la enfermedad de Crohn. MAP3773c ha sido identificada como una proteína similar a FUR que hipotéticamente funciona como un factor de transcripción que puede regular la expresión de los genes circundantes. El objetivo de este estudio fue investigar la expresión del gen MCP-1 implicados en la respuesta inmune. En la metodología de investigación, el gen *map3773c* fue clonado en pCDNA3.1, posteriormente fue transfectado a macrófagos utilizando diferentes tratamientos, posteriormente se midió la expresión de la proteína MAP3773c por Western blot, luego se analizó la expresión de MCP-1, utilizando la técnica ELISA en extractos de cultivo de macrófagos. Los resultados que obtuvimos fueron la expresión de la proteína a las 24 horas en tratamientos con hierro, además de una disminución en la expresión de MCP-1 en macrófagos transfectados en comparación con un control no transfectado a las 24 y 48 horas. del tratamiento. Nuestros resultados sugieren que MAP3773c es uno de los constituyentes de MAP que inhiben la respuesta inmune celular, además de una disminución de la quimiotaxis, lo que reduciría la respuesta inmune. Estos hallazgos sugieren que MAP3773c puede ser un factor de virulencia durante la infección por MAP.

## **ABSTRACT**

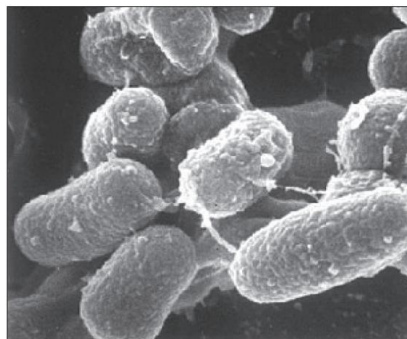
*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is a causal agent of chronic granulomatous intestinal disease in animals and is associated with various autoimmune diseases in humans such as Crohn's disease. MAP3773c has been identified as a FUR-like protein that hypothetically functions as a transcription factor that can regulate the expression of surrounding genes. The objective of this study was to investigate the expression of MCP-1 gene involved in the immune response. In the research methodology, the map3773c gene was cloned in pCDNA3.1, subsequently it was transfected into macrophages using different treatments, subsequently the expression of the MAP3773c protein was measured by Western blotting, then we analyzed the expression of MCP-1, using the ELISA technique in macrophage culture extracts. The results we obtained were the expression of the protein at 24 hours in treatments with iron, in addition to a decrease in the expression of MCP-1 in transfected macrophages compared to an untransfected control at 24 and 48 hours. of treatment. Our results suggest that MAP3773c is one of the MAP constituents that inhibit the cellular immune response, in addition to a decrease in chemotaxis, which would reduce the immune response. These findings suggest that MAP3773c may be a virulence factor during MAP infection.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

*Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* (MAP). Es una bacteria acidorresistente débilmente Gram-positiva que causa la enfermedad de Johne o paratuberculosis en animales, especialmente en rumiantes [1-3]. También está implicado en la causa de la enfermedad de Crohn (enfermedad inflamatoria intestinal) en humanos [4]. La paratuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más graves del ganado lechero en todo el mundo, causando pérdidas considerables en la producción en términos de reducción de la producción de leche, reducción en el aumento de peso, aumento en el sacrificio/muerte y un aumento del costo del control de la enfermedad [1,5].

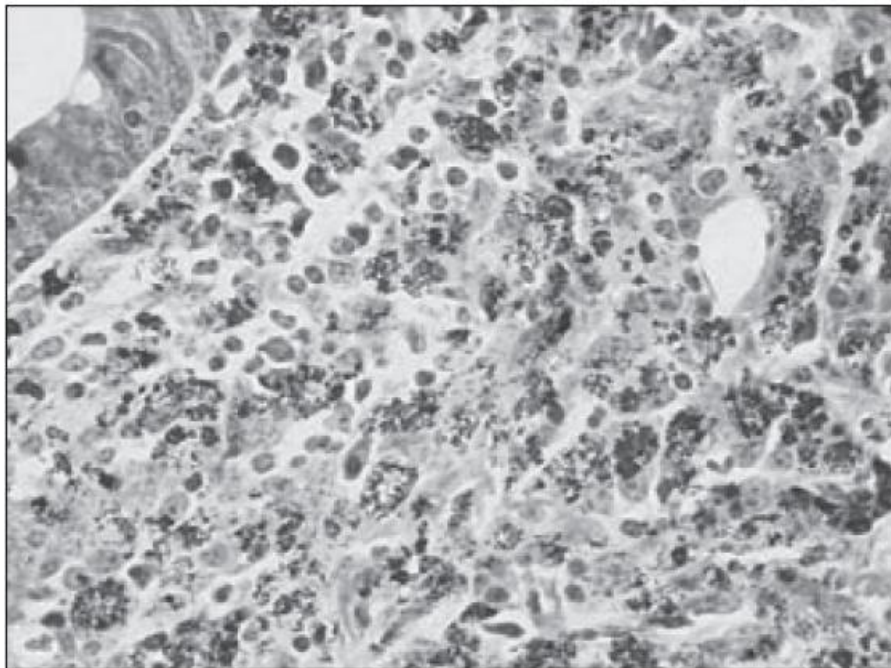
Entre los atributos de una bacteria potencialmente patógena se encuentran su capacidad para acceder a un huésped susceptible, establecerse a través de la evasión de los mecanismos de defensa del huésped y multiplicarse en el huésped, lo que conduce a la enfermedad o daño tisular y eventualmente la diseminación a otros huéspedes [6]. Los factores genéticos que permiten al organismo alcanzar estos atributos patógenos se consideran factores de virulencia. Todavía queda mucho por entender sobre la patogenia de MAP y su virulencia en sus numerosos huéspedes. Existen informes de diferencias en la virulencia entre las diversas cepas que existen, así como diferencias en las susceptibilidades del huésped [7].



**Figura 1. Micrografía electrónica de barrido que muestra la capa gruesa y cerosa de *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Cortesía de Johne's Testing Center, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Wisconsin (Wisconsin, EE. UU.) [44]**

## 1.1. Clasificación taxonómica de MAP

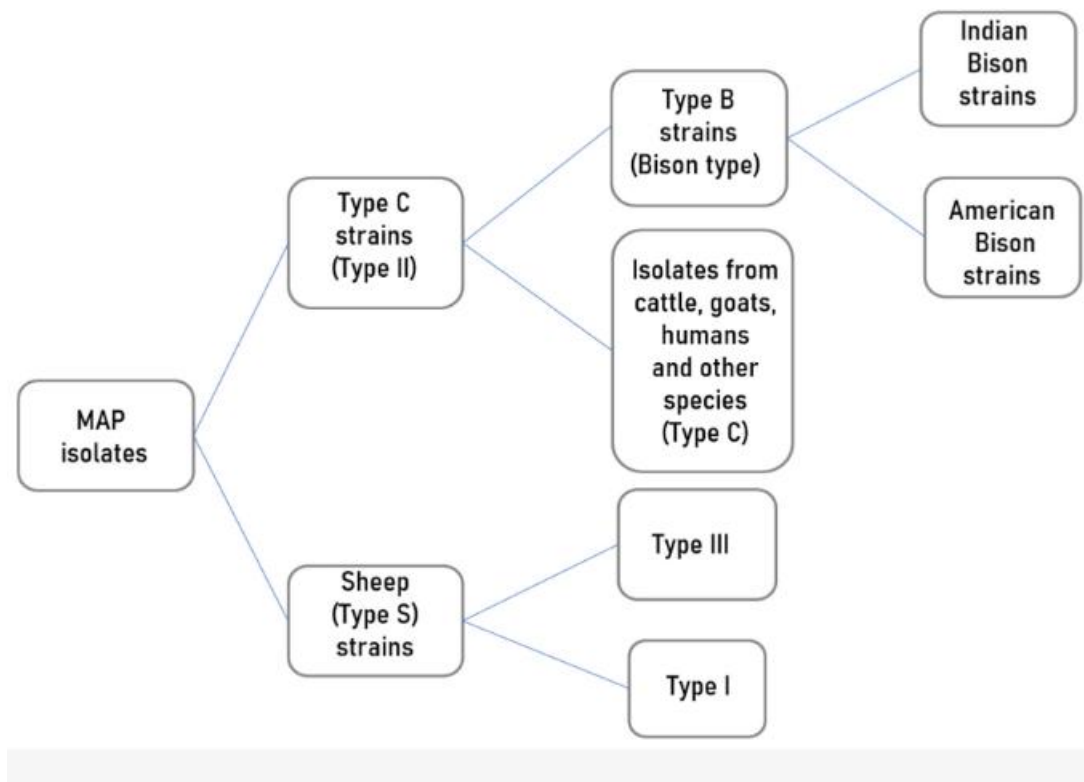
*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* es un bacilo grampositivo, aeróbico, inmóvil, no formador de esporas y acidorresistente perteneciente al género *Mycobacterium* de la familia Mycobacteriaceae y es miembro del complejo *Mycobacterium avium complex* (MAC) [8]. Los MAC están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, en animales sanos y en seres humanos y no suelen causar enfermedades a menos que el huésped esté debilitado o inmunodeprimido. Otros miembros del complejo MAC son: *M. avium avium*, *M. avium silvaticum*, *M. colombiense* & *M. Intracellulare*. Pertenecen al grupo de micobacterias de crecimiento lento, que tarda entre 8 y 16 semanas en producir colonias visibles en medios sólidos como los medios a base de huevos, como el medio Löwestein-Jensen, el medio de yema de huevo de Herrold y medios sintéticos como Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11, aunque algunas cepas pueden tardar hasta 6 meses [3,7]. La MAP se clasifica bioquímicamente como dependiente de la micobactina suministrada externamente, aunque se ha descubierto que algunas cepas solo son dependientes de la micobactina.



**Figura 2. Tinción de Ziehl-Neelsen del íleon terminal de una vaca que muestra la naturaleza acidorresistente de *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Cortesía de Johne's Testing Center, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Wisconsin (Wisconsin, USA) [44]**

### 1.1.2. Diversidad de cepas MAP

Principalmente, se reconocen tres grandes grupos de cepas MAP en función de sus características de crecimiento, pigmentación de la colonia y asociaciones de hospedadores el tipo de oveja o "Tipo S", el tipo de ganado vacuno o "tipo C" y el bisonte o "tipo B" [9]. Algunas de las técnicas moleculares utilizadas en la tipificación de cepas MAP para la identificación de la diversidad genética incluyen: polimorfismo de longitud de fragmento de restricción IS900 (RFLP) [10], IS1311 RFLP, análisis de enzimas de restricción de reacción en cadena de la polimerasa IS1311 (PCR-REA) [11], electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) [12]; análisis de repetición de secuencia corta (SSR) [13], análisis de repetición en tándem de número variable unitario repetitivo intercalado con micobacterias (MIRU-VNTR) [14] y tipificación de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) [15]. Estas técnicas de tipificación han dividido a MAP en tipo I, II & III (véase figura 1). El tipo I se aísla predominantemente de ovejas (Tipo S) y el tipo II es para asilados de ganado vacuno y otros animales, así como humanos. El tipo III es un subgrupo del tipo S. Sobre la base del análisis SNP del IS1311, cuando MAP a sido aislado por primera vez de un bisonte de Montana EE.UU., se ha clasificado como Tipo B [16]. & con análisis moleculares adicionales, se encontró que este tipo de bisonte difiere de un tipo similar de la india que dio lugar al tipo de bisonte indio [17]. Las cepas de tipo B son un subtipo del tipo C, pero no se limitan al bisonte. El tipo III y el tipo I parecen ser subgrupos del tipo ovino [14]. Estudios recientes recomiendan que la caracterización de MAP debe basarse en el análisis de la secuencia del genoma completo (WGS) de marcadores genéticos como elementos de inserción, secuencias repetitivas y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) [14,18] para una mejor resolución, aunque esto sería muy costoso para estudios epidemiológicos pequeños.



**Figura 3. Una ilustración de la diferenciación de cepas MAP basada en el análisis filogenético, basado en SNP del genoma completo [14].**

## 1.2. Paratuberculosis

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne (JD) es una enfermedad contagiosa crónica de los animales causada por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). La enfermedad fue descrita por primera vez por Johne y Frothington en 1895 y reportada por primera vez en ovejas en Bosnia en 1908. [19,20]. La paratuberculosis afecta principalmente a rumiantes domésticos y silvestres en todo el mundo [21], además, puede afectar a muchos animales no rumiantes, como camellos, conejos salvajes, cerdos, caballos, aves y carnívoros [22,23]. Además, la MAP se ha detectado en pacientes con enfermedad de Crohn y se asoció con otras enfermedades humanas, como la artritis reumatoide, la tiroiditis de Hashimoto, la diabetes tipo 1, la esclerosis múltiple y el autismo, según lo presentado por Garvey [24]. Por lo tanto, la enfermedad puede considerarse un peligro potencial para la salud pública [25].

La paratuberculosis puede sospecharse a partir de los signos clínicos (diarrea intermitente y pérdida de peso a pesar de buen apetito) y la detección de bacilos acidorresistentes mediante examen microscópico en heces, cultivo fecal o de tejidos, pruebas serológicas y métodos moleculares. Las infecciones subclínicas no detectadas contribuyen en gran medida a la contaminación del medio ambiente y a la propagación de la enfermedad [26]. Sin embargo, una de las principales limitaciones de la realización de estudios de prevalencia de PTB es la dificultad en su diagnóstico. Una prueba diagnóstica adecuada, sensible y confirmatoria es un requisito previo para estos estudios y, por tanto, para programas de control eficaces [27].

En África, la PTB patológica puede considerarse una enfermedad tropical desatendida debido a la escasa concienciación sobre su incidencia en las poblaciones de ganado y a la falta de documentación y presentación de informes; por lo tanto, no se consideró en los programas de investigación y control [28,29,30]. La PTB es una enfermedad de la lista de la organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (B) y debe notificarse a la organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como se indica en el Código Sanitario para los Animales Terrestres [31].

Las lesiones intestinales del PTB causan fuga de proteínas, afectan el microbioma intestinal e interfieren con el metabolismo intestinal, causando pérdida de nutrientes y desgaste muscular [32,33]. Por lo tanto, al igual que el ganado bovino, la PTB en pequeños rumiantes causa grandes pérdidas económicas en términos de bajas ganancias de peso, disminución de la producción de leche, sacrificio temprano y muerte [34,35], además de costos relacionados con el diagnóstico y control de enfermedades [36].

Los pequeños rumiantes contribuyen significativamente al alivio de la pobreza en las comunidades pobres de África y Asia mediante el suministro de carne, leche y pieles, y como fuente de ingresos a través de las exportaciones de animales [37]; También son un animal compacto que cuesta poco alimentar y no cuesta mucho obtener sus primeras crías. Este papel se vería muy reducido por las enfermedades crónicas, como el PTB, en ausencia de buenos servicios veterinarios y programas de control de enfermedades. Sin embargo, en los países donde la cría de ovejas y cabras está bien establecida, las

pérdidas de producción debidas a la infección por MAP parecen estar mejor documentadas y evaluadas económicamente [38].

En Australia, se informó que la tasa de mortalidad anual promedio debido a PTB en 12 rebaños de ovejas varió entre 6,2 y 7,8%, lo que resultó en una disminución de 6,4 y 8,5% del margen bruto promedio [39]. En algunos lotes, la mortalidad anual se acercó al 20% [40]. En Nueva Zelanda, las pérdidas anuales estimadas fueron de US\$ 1,5 por oveja infectada con MAP de lana fina Merino, principalmente debido a una tasa de letalidad de 1,2-2,7% [38]. En la industria ovina británica, las pérdidas anuales debidas al PTB se estimaron en libras esterlinas de 0,5 a 16,5 millones [40]. También se informó que las granjas lecheras de ovejas y cabras en Italia sufrieron una disminución en la eficiencia de las ganancias del 84% al 64% debido a la infección por MAP [41, 42].

### **1.2.1. Enfermedad de Crohn**

La prevalencia mundial de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) ha ido en aumento desde el año 2000, y la EII afecta actualmente hasta 1 de cada 200 individuos en los países occidentales [45,46]. La EII abarca dos trastornos distintos, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que difieren en la fisiopatología, las partes afectadas del tracto gastrointestinal (GI), los síntomas, las complicaciones, el curso de la enfermedad y el tratamiento. La causa de la enfermedad de Crohn aún no está del todo clara, pero los factores genéticos, inmunológicos y ambientales contribuyen al riesgo de aparición y progresión de la enfermedad [47].

La EC se caracteriza por lesiones intestinales salteadas (es decir, áreas de inflamación interpuestas entre mucosas de apariencia normal) en cualquier parte del tracto gastrointestinal, e implica una inflamación transmural crónica y recurrente que puede provocar dolor abdominal crónico, diarrea, obstrucción y/o lesiones perianales [47]. La CU afecta solo al colon, las lesiones son continuas y la inflamación es superficial, lo que puede provocar erosiones, úlceras y diarrea sanguinolenta.

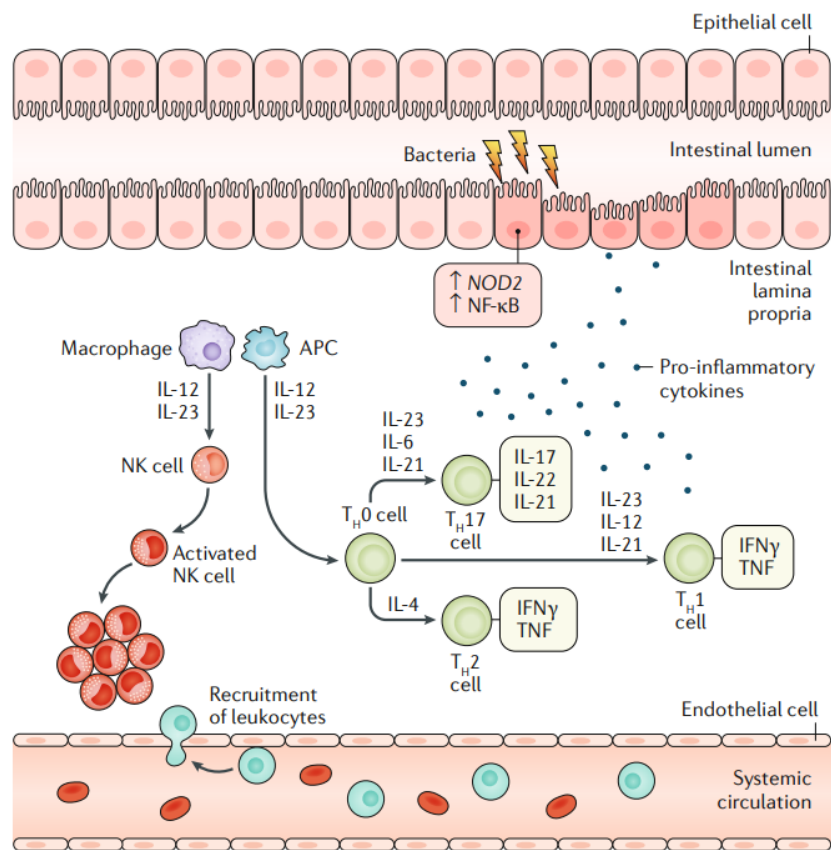
La colitis ulcerosa afecta solo al colon, las lesiones son continuas y la inflamación es superficial, lo que puede provocar erosiones, úlceras y diarrea sanguinolenta. La EC es progresiva y destructiva: entre el 21 y 47% de los pacientes también presentan

manifestaciones extraintestinales sistémicas (MEI), que afectan fuertemente a los pacientes de muchas maneras, como su calidad de vida y los resultados a largo plazo, incluido el riesgo de hospitalización, complicación y cirugía [47].

En la actualidad, la cicatrización de la mucosa es el objetivo de tratamiento preferido, ya que los pacientes que logran la cicatrización de la mucosa tienen mejores resultados, incluyendo un menor riesgo de cirugía, tasas de recaída más bajas y una mejor calidad de vida [48]. En las últimas dos décadas, el uso de tratamientos antiinflamatorios, como la terapia con factor de necrosis tumoral (anti-TNF) (por ejemplo, infliximab, adalimumab y certolizumab), han transformado el tratamiento de la EC. Estos fármacos se están utilizando en una fase más temprana del curso de la enfermedad y ahora se consideran el tratamiento de elección, especialmente para los pacientes con alto riesgo de progresión de la enfermedad. Aunque estas terapias biológicas dirigidas son un avance notable en el tratamiento de la EC, la necesidad de administración parental y el potencial de inmunogenicidad son inconvenientes importantes. Otras terapias biológicas para la EC incluyen el anticuerpo antiintegrina monoclonal selectivo para el intestino vedolizumab y un antagonista de la señalización de IL-12 e IL-23, ustekinumab, para la terapia de inducción y el mantenimiento de la remisión en pacientes con EC de moderada a grave [47,48].

Las causas de la enfermedad de Crohn demuestran que la homeostasis intestinal se mantiene por el equilibrio entre el contenido luminal y el sistema inmune de la mucosa en la lámina propia. El epitelio intestinal orquesta este equilibrio debido a su función mecánica (como barrera física) pero también a su papel en las respuestas inmunitarias. Las células epiteliales intestinales (IEC) especializadas tienen un papel importante en la inmunidad intestinal. Por ejemplo, las células de Paneth, son IEC presentes en la base de las criptas de Lieberkühn y producen constitutivamente péptidos antimicrobianos, mientras que las células microfold son IEC presentes en el tejido linfoide asociado al intestino que toman muestras de antígenos luminales y los presentan a las células del sistema inmunitario adaptativo. Después del contacto con un antígeno, las células presentadoras de antígeno (CPA), como las células dendríticas, presentan antígeno a las células T y a las células B para iniciar una respuesta inflamatoria controlada. En

enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn, disfunción de la barrera epitelial (debida, por ejemplo, a polimorfismos de los genes de la vía de señalización NOD2 y del factor Kb (NF-κB) hace que el contenido luminal entre en la lámina propia, lo que hace que las células dendríticas activen los tipos de células T inflamatorias, como las células T auxiliares (TH0), las células helper 1 (TH1), las células TH17 y las células TH2. Que producen citocinas proinflamatorias, como el IFNγ y el factor de necrosis tumoral (TNF). Además, en respuesta a los contenidos luminales, los macrófagos producen las citocinas proinflamatorias IL-12 e IL-23, que activan las células asesinas naturales (NK), lo que resulta en la perpetuación de la inflamación intestinal con producción de citocinas proinflamatorias. Los contenidos luminales incluyen los componentes de la dieta y la microbiota intestinal. Las células TH0 también producen IL-4, IL-6, IL-21 e IL-22 en respuesta a la activación de las células dendríticas. Véase figura 4 [19,45].



**Figura 4. Causas de la enfermedad de Crohn [45].**

### **1.2.2. Susceptibilidad a la infección por MAP**

El riesgo de aparición y progresión de la PTB está influenciado por factores ambientales en un huésped genéticamente susceptible.

Los rumiantes domésticos (bovinos, ovinos y caprinos) son los animales comúnmente afectados por MAP [19,49]. La susceptibilidad a la infección por MAP disminuye con la edad; por lo tanto, la edad, junto con la dosis infectante y algunos otros factores, contribuyen a limitar la propagación de MAP [50]. Ahora se sabe que no todos los animales expuestos a MAP desarrollan EC algunos al parecen eliminar la infección espontáneamente. También se sospecha que algunas razas rumiantes son más resistentes a la infección por MAP que otras; se ha reportado que las ovejas merinas son más susceptibles a PTB que las Romney [51]. En la India, se encontró que las razas de cabras de granja de Uttar Pradesh estaban mejor adaptadas al tipo de bisonte indio de MAP que las cabras de granja en Rajasthan [52]. El estudio de Begg y colaboradores [33=53] proporciona evidencia de una posible susceptibilidad diferencial a la enfermedad ente razas de ovejas expuestas a la infección por MAP. Sin embargo, cuando se comparan las cabras, y el ganado vacuno son más susceptibles y es probable que desarrollen signos clínicos de infección por MAP, mientras que las ovejas son más resistentes al desarrollo de la enfermedad clínica [54]. Se encontró que las ovejas, las cabras y los terneros eran bastante comparables como modelos de infección para MAP, aunque existen algunas diferencias en las respuestas del huésped a la infección entre ellos [55].

### **1.2.3. Transmisión de MAP**

MAP se transmite principalmente a través de la ingestión de alimentos o agua contaminada con estiércol. La infección es más común en animales jóvenes a través de la ingestión de calostro y leche contaminados por parte de las hembras infectadas. El microorganismo también puede transmitirse de una hembra embarazada infectada a su feto a través de la placenta [56]. Un rebaño no infectado generalmente se expone a través de la expansión del rebaño o la compra de reemplazo de animales portadores [57].

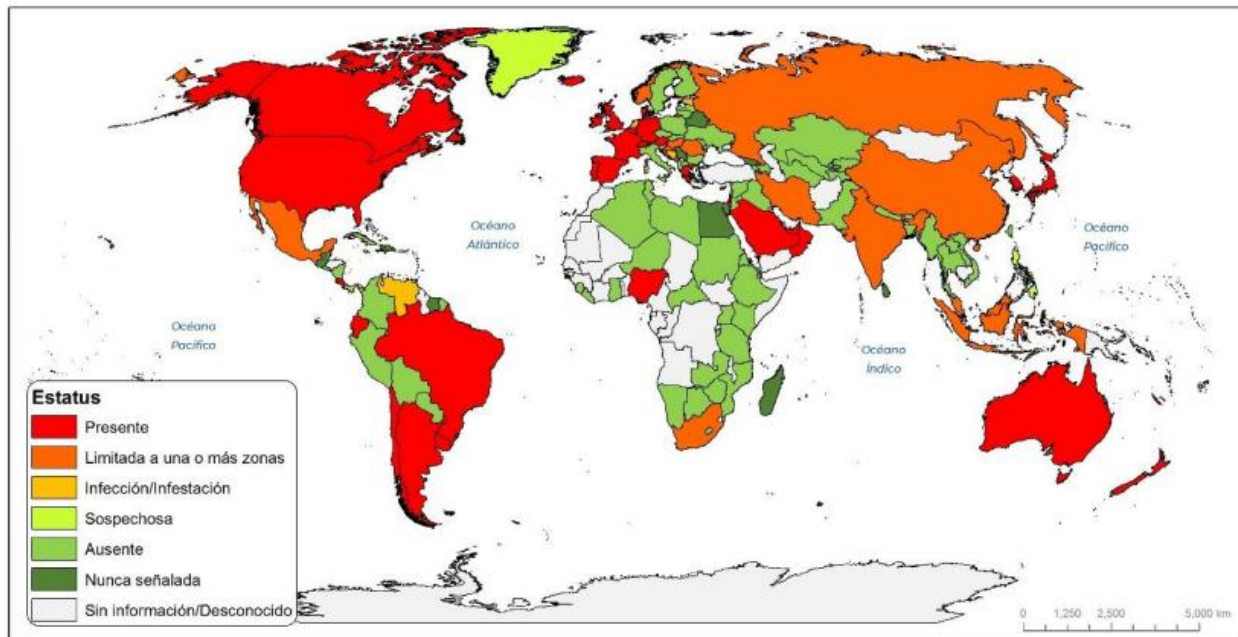
### **1.2.4. Signos clínicos de PTB.**

Los animales suelen infectarse durante las primeras semanas de vida, pero pueden infectarse a cualquier edad. El PTB clínico en ovinos y caprinos se observa principalmente en animales de 2 a 4 años de edad; Los signos a menudo ocurren poco después de dar a luz [58]. Los factores de estrés pueden acelerar la aparición de la enfermedad clínica. Sin embargo, los signos clínicos en ovejas o cabras no son un indicador fiable de la presencia o ausencia de infección por MAP [59]. La pérdida de peso es el signo clínico predominante en ovejas y cabras infectadas. En las ovejas, el período de pérdida de peso difiere de un animal a otro. El reblandecimiento de las heces o la diarrea se producen solo en el 20% de los casos en las etapas finales de la enfermedad [60]. Se han notificado casos de hipoproteinemia con edema intermandibular en ovejas. Además de la hipoproteinemia, se ha observado una disminución del calcio sérico en ovinos y bovinos con TBP clínico [61]. Los animales afectados pueden mostrar pérdida de apetito, opacidad y pelaje áspero con alopecia [62]. Los signos clínicos clásicos de TBP en cabras son similares a los de las ovejas, pero sin evidencia de diarrea [63]. Las cabras infectadas subclínicamente excretan MAP de forma intermitente en las heces hasta un año después de la infección. Durante la enfermedad clínica, los animales se vuelven demacrados y desarrollan anticuerpos contra MAP, que son detectables en las heces. La enfermedad clínica avanzada se asocia con pérdida de peso progresiva, piel frágil, pelaje deficiente, edema submandibular, deshidratación, anemia y depresión [64].

### 1.2.5. Prevalencia y distribución de paratuberculosis en pequeños rumiantes.

Datos recientes indican que el 50% de los rebaños bovinos europeos y norteamericanos podrían estar infectados con MAP, además de que el daño asociado a la infección incluye pérdidas económicas resultantes de la disminución de producción de lácteos hasta en un 10% o incluso al sacrificio de los animales infectados; las vacunas actuales no confieren protección completa y causan interferencia con otras pruebas diagnósticas como la tuberculosis bovina, por lo que el desarrollo de pruebas de diferenciación de los animales infectados de los vacunados es importante. [34]

Según datos de la organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la enfermedad se encuentra presente en la mayoría de los países de América del Norte y del Sur, y en el mundo una importante proporción cuenta con el estatus de enfermedad limitada a una o más zonas, entre ellos México (Ver figura 5).



**Figura 5. Estatus internacional de Paratuberculosis (organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2019)**

A nivel mundial, un total de 33 países tienen la presencia declarada de la enfermedad, 14 cuentan con el estatus de presencia pero limitada a una o más zonas dentro de su territorio y 4 países tienen sospecha no confirmada de su presencia; con un menor riesgo, 82 países poseen el estatus de enfermedad ausente, en 26 países la enfermedad nunca ha sido señalada esta, y por ultimo 93 países no poseen información o su estatus es desconocido. La paratuberculosis es endémica y está muy extendido en ovejas, cabras, ganado lechero y de carne, alpaca, llama y ciervo en las partes templadas. [34,35]

Se observó que no se han realizado estudios que proporcionen estimaciones válidas de la prevalencia de PTB en ovejas y cabras en los estados Unidos, debido a la falta de pruebas diagnósticas estandarizadas y financiación para la investigación en pequeños rumiantes.

La situación en México esta enfermedad se encuentra en el grupo 3 del "Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres", el cual está constituido por aquellas enfermedades y plagas que se encuentran presentes en territorio nacional consideradas como endémicas, mismas que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y para el comercio nacional e internacional, ya que pueden ser controlables a través de las buenas prácticas pecuarias y deben ser de notificación mensual obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica y se encuentra específicamente en el subgrupo 1) en donde se concentran las enfermedades comunes a varias especies. [35].

La organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) la considera como una enfermedad de notificación obligatoria, lo que puede coadyuvar a controlar su diseminación en los países miembros, al tener la obligación de contabilizar y reportar los casos presentes en sus territorios, a pesar de esto, dificultad del diagnóstico debido a los largos periodos de incubación del agente y su similitud clínica con otras enfermedades del ganado, hacen que la medición de su impacto y distribución real sea compleja, generando una subestimación en su registro. [34-36].

Esta enfermedad suele causar problemas en animales adultos; al no existir un tratamiento satisfactorio para la enfermedad (aunque algunas combinaciones de antibióticos podrían ser exitosas), se requeriría de un tratamiento a largo plazo, el cual generalmente no es viable para los productores de estas especies productivas, de este modo la enfermedad es capaz de producir no sólo importantes mermas en la producción al generar un bajo rendimiento de los animales afectados, sino también la pérdida de aquellos para los que el tratamiento no es viable [35].

La alta sobrevivencia o persistencia de la bacteria en materia fecal, hace de vital importancia el fomento de las buenas prácticas pecuarias, así como la implementación por parte de los productores de medidas de bioseguridad en las explotaciones de pequeños y grandes rumiantes.

## II. ANTECEDENTES

### 1. Transmisión de la enfermedad.

Si bien algunos terneros pueden infectarse con MAP en el útero, se cree que la mayoría de las infecciones ocurren durante el período neonatal. Por lo general, MAP ingresa al ternero a través de la vía oral al consumir material infectado (tierra, heces, leche infectada con MAP o calostro) o como resultado del contacto oral con superficies contaminadas, incluidas las ubres. [65].

MAP también puede ser transferida por otros fluidos corporales como la saliva, el líquido uterino o el semen [66,67]. Estudios recientes han indicado que la MAP también puede adquirirse a través de la inhalación de aerosoles. La transmisión vertical de MAP es la más común, sin embargo, también se ha observado la transmisión horizontal de cría a cría o de cría a fauna silvestre contaminada y de fauna silvestre contaminada a crías, que podrían incluir insectos [68,69].

Si bien los reservorios de enfermedades de la fauna silvestre representan una fuente potencial de infección, MAP ingresa con mayor frecuencia a un rebaño de ganado a través de la adquisición de una vaca infectada [69]. La susceptibilidad del ganado bovino a la infección por MAP depende en gran medida de la edad. Los terneros experimentan la mayor susceptibilidad durante los primeros meses de vida, con un aumento de la tolerancia que se desarrolla entre cuatro meses y un año [70].

Al año de edad, los terneros alcanzan un nivel de resistencia a MAP comparable al de una vaca adulta: pueden infectarse con MAP, pero esto requiere dosis infecciosas más altas y períodos de exposición más largos [71,72]. El aumento de la susceptibilidad de los terneros jóvenes a la infección por MAP puede deberse a una serie de factores contribuyentes. La mayor porosidad del intestino abierto de los terneros recién nacidos puede ofrecer una mayor oportunidad para la pinocitosis de MAP [72]. Los anticuerpos maternos contra MAP dentro del calostro también pueden promover la absorción de MAP a través de una opsonización mejorada de la bacteria [73]. Por último, una inmadurez general del sistema inmunitario innato y/o adaptativo puede contribuir a una mayor susceptibilidad de los terneros recién nacidos a la infección por MAP [74,75].

## **2. Resistencia del huésped a la infección.**

Es importante destacar que solo el 10-15% del ganado expuesto a la enfermedad clínica MAP se desarrolla, lo que indica que la mayoría de los terneros controlan con éxito la infección [76].

Es probable que la capacidad de los animales individuales para controlar con éxito una infección por MAP refleje factores contribuyentes, como el huésped, salud y genética, condiciones ambientales, dosis infecciosas y variables asociadas a diferentes cepas de MAP. Se han realizado numerosos esfuerzos para identificar factores genéticos específicos del huésped que predicen la susceptibilidad de MAP. Estas investigaciones se llevan a cabo normalmente con el objetivo de identificar biomarcadores que guíen la cría de animales tolerantes a las enfermedades. Desafortunadamente, como podría esperarse, la susceptibilidad genética bovina a la infección por MAP es compleja.

Esto es quizás mejor ejemplificado por un reciente meta-análisis de dos estudios de asociación de todo el genoma que revelaron múltiples loci asociados con la infección por MAP en el ganado que involucra 11 cromosomas diferentes [77].

La identificación de predictores genéticos de resistencia a MAP se complica aún más por la especificidad de algunos de estos biomarcadores. Por ejemplo, en los animales cruzados Brahman-Angus existe una asociación entre el estado de infección y el gen del dominio de reclutamiento asociado a caspasas 15 (CARD15) que no se encuentra en el ganado Holstein [78]. Se han propuesto otros genes de resistencia prioritarios basados en i) la participación en otras enfermedades micobacterianas, ii) el papel en la defensa del huésped y iii) como asociaciones con la enfermedad de Crohn, incluyendo la familia de portadores de solutos 11 miembro 1 (SLC11A1) (también conocidos como NRAMP1), receptores tipo Toll (TLRs), complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y citocinas (interleucina-10 e interferón gamma) y sus receptores [79].

### **3. Amenaza zoonótica de MAP**

Los costos económicos, así como las consideraciones de salud animal y bienestar, son suficientes para definir la enfermedad de Crohn como una prioridad para la industria ganadera. Sin embargo, la enfermedad ha adquirido una importancia aún mayor con la posible implementación de MAP como agente causal o factor contribuyente en la enfermedad de Crohn, una enfermedad inflamatoria intestinal de los seres humanos [80]. A falta de pruebas definitivas sobre la contribución de MAP a la enfermedad de Crohn, mitigar el riesgo de transferencia de MAP del ganado a los seres humanos puede ser una medida de precaución importante. La reducción de la transmisión de MAP en el ganado no solo tendría un impacto positivo significativo en la percepción pública, sino que la reducción de la transmisión de MAP en el ganado tendría beneficios económicos directos para los productores ganaderos. Por sí solos, los aspectos de salud y bienestar animal de la enfermedad son lo suficientemente importantes como para justificar el desarrollo y la implementación de un programa de vacunación que pueda prevenir la transmisión de MAP. Históricamente, la vacunación ha sido una herramienta extremadamente eficaz para el control de enfermedades infecciosas en humanos y animales.

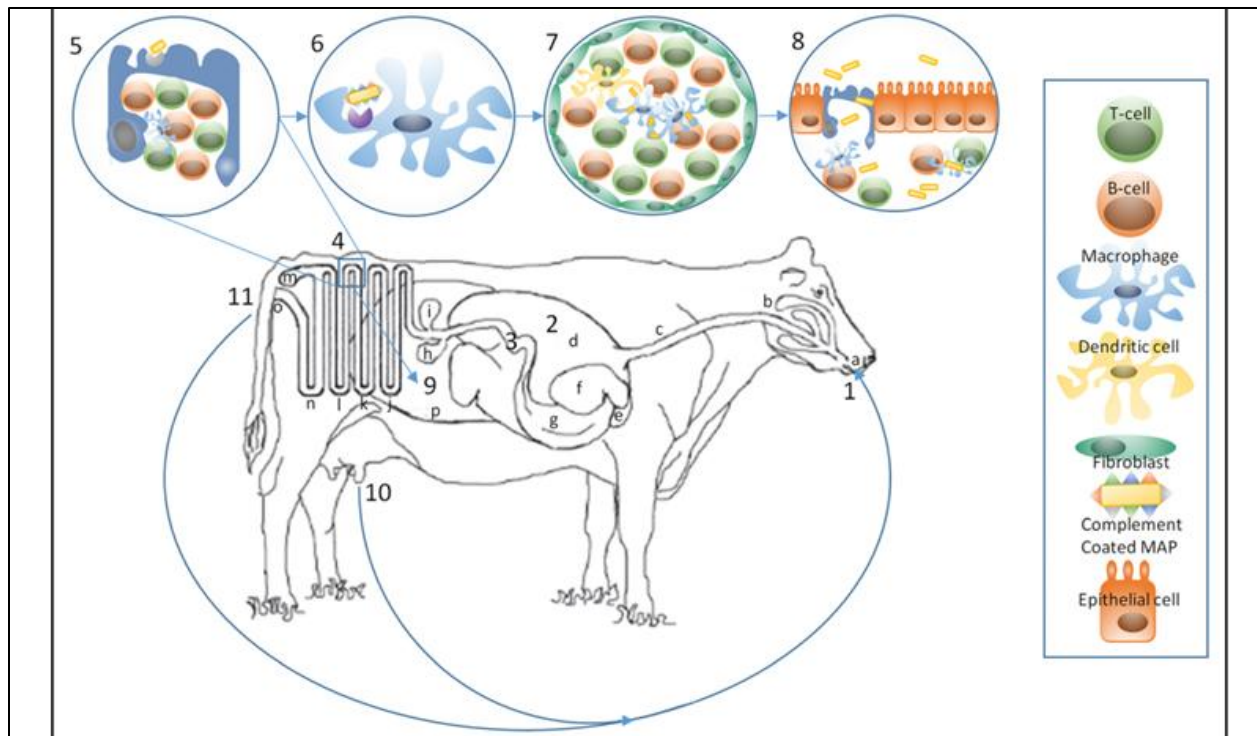
Desafortunadamente, los esfuerzos para desarrollar una vacuna efectiva para la MAP han tenido un éxito limitado [81]. Si bien la vacuna BCG inicial desarrollada a principios de 1900 todavía se utiliza, la utilidad funcional de esta vacuna se limita en gran medida a la reducción de la diseminación de MAP por parte de los animales infectados [82]. Mycopar® (cepa 18), una vacuna MAP inactivada entera, solo ha mostrado protección contra la enfermedad clínica, pero no infección, lo que podría exacerbar el problema de los portadores asintomáticos [82]. El éxito limitado de los enfoques tradicionales de desarrollo de vacunas para la EJ indica que se requiere una mayor comprensión de los mecanismos de virulencia de MAP para adoptar un enfoque más estratégico en el diseño de vacunas. Específicamente, proponemos que la comprensión de los mecanismos por los cuales MAP subvierte las respuestas inmunitarias del huésped formará la base para desarrollar y evaluar una vacuna efectiva.

### **3.1. Etapas de la infección de MAP**

En concreto, las defensas del huésped se activaron y las contramedidas bacterianas empleadas durante el período comprendido entre la captación oral de MAP y el establecimiento de una infección persistente en los macrófagos. Este período crítico se puede subdividir en dos etapas funcionales distintas: 1) Invasión MAP del intestino y 2) Infección y supervivencia de los macrófagos. Dentro de cada etapa, MAP se encuentra con una variedad de sistemas de defensa del huésped que deben evitarse o subvertirse para que el patógeno establezca la infección. Los esfuerzos de los MAP para establecer la infección no se limitan a consideraciones de las condiciones que existen dentro de un solo animal; Se extienden a los cambios en las condiciones que existen entre los hospederos.

Dentro de los rebaños infectados, la transmisión horizontal de MAP a menudo ocurre durante la lactancia de los terneros de una madre infectada. Patel et al. demostraron que la preincubación de MAP en células epiteliales mamarias o leche aumentaba la capacidad de los MAP para infectar células epiteliales bovinas, lo que sugiere que el entorno celular dentro del huésped infectado prepara al patógeno para la invasión de células epiteliales íntimas del próximo huésped objetivo [80]. El análisis de expresión génica atribuyó este aumento de la virulencia a un pequeño subconjunto de genes que incluía factores de virulencia y genes específicos de MAP de función desconocida [83]. Los modelos de provocación oral sugieren que MAP puede invadir el huésped ya en la mucosa oral de las amígdalas. Esta conclusión está respaldada por modelos que han demostrado que las criptas amigdalinas son una ruta para la infección por MAP [84].

Tras la entrada a través de las amígdalas, se propone que MAP se propaga a los ganglios linfáticos mesentéricos y al íleon a través de la sangre [85]. Sin embargo, existe cierta preocupación sobre la importancia fisiológica de estas vías de infección. Los modelos de infección oral menos agresivos, que utilizan dosis más bajas de MAP, han implicado al íleon como el punto principal de invasión de MAP [85] (Figura 6).



**Figura 6. Absorción de MAP ingerida por vía oral**

La figura 6 explica la absorción de MAP ingerida por vía oral, se ingiere (1) y viaja a través del gastrointestinal. También puede ser adquirido en las criptas amigdalinas y transportado al íleon. En el lumen (2) se activa FAP de la bacteria y es opsonizada por la fibronectina al entrar en el tracto digestivo inferior (3). Después de alcanzar el íleon (4), MAP es fagocitada por mas células M de los parches de Peyer tras el reconocimiento de la bacteria a través del receptor de fibronectina (5) y viaja a través del epitelio hasta los macrófagos intraepiteliales, que absorben MAP recubierta de complemento a través de los receptores del complemento (6). Los macrófagos infectados forman granulomas (7), que albergan infecciones latentes por MAP. Durante la enfermedad activa (8), MAP puede transmitirse a un ternero neonato.

Después de la ingestión oral de MAP, si bien todas las regiones del intestino delgado deben estar expuestas a las bacterias, cada vez hay más evidencia de diferencias regionales significativas en el desarrollo del sistema inmune de la mucosa durante el período neonatal [75]. La caracterización adicional de las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas después de la infección por MAP en sitios específicos a lo largo del tracto gastrointestinal puede ser de considerable importancia para comprender la patogénesis

de MAP. Será importante determinar si el parche de Peyer ileal (PP) realmente proporciona un portal de entrada único por el cual MAP establece infecciones persistentes. Hay cambios marcados dependientes de la edad en la estructura y función de este tejido linfoide [87] que pueden ser consistentes con una susceptibilidad dependiente de la edad a la infección por MAP.

### **3.2. Infección y supervivencia del macrófago.**

Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la interacción huésped-patógeno de la enfermedad. No sólo sirven como un efecto central para mediar la destrucción de MAP, sino que también, en caso de subversión por MAP, estos pueden transformarse en refugios protegidos para la supervivencia, proliferación y diseminación del patógeno.

### **3.3. Invasión de los macrófagos por MAP**

Después de penetrar la barrera epitelial intestinal, MAP invade específicamente a los macrófagos subepiteliales, que tienen varias familias de receptores involucrados en la absorción de micobacterias: Los receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4), los receptores de inmunoglobulinas (FcR), el receptor de manosa y los receptores secuestradores [85-87]. Las diferentes rutas de entrada a los macrófagos pueden tener consecuencias importantes para la supervivencia intracelular, cada una de las cuales utiliza diferentes sistemas mediadores por receptores y da lugar a patrones únicos de secreción de citocinas que inducen respuestas inmunitarias diferenciales [85,87]. En particular, la absorción a través de los receptores del complemento limita la activación de los macrófagos. La absorción preferencial de MAP en los macrófagos bovinos a través del sistema del complemento puede representar una estrategia de la bacteria para evadir las defensas críticas del huésped.

### **3.4. Bloqueo de la fusión de fagolisosomas**

Uno de los procesos más críticos en el establecimiento de una infección persistente ocurre inmediatamente después de la entrada de MAP en el fagosoma de los macrófagos. A través de cambios programados en los marcadores de membrana y la acidificación del compartimento interno, los fagosomas experimentan un desarrollo gradual hasta un endosoma tardío. La fusión de los endosomas tardíos con los

lisosomas, creando fagolisosomas, genera un entorno que se adapta química y bioquímicamente para la destrucción de las partículas internalizadas, incluido MAP [83]. La supervivencia de las bacterias internas depende de su capacidad para interrumpir la formación del fagolisosoma maduro con el fin de evitar las reacciones de hidrólisis y oxidación resultantes. La inhibición del fagosoma, la acidificación y la fusión de fagolisosomas representan mecanismos críticos por los cuales las micobacterias sobreviven dentro de los macrófagos. Dada la importancia de la maduración fagolisosomal, tal vez no sea sorprendente que MAP emplee una serie de mecanismos complementarios y potencialmente redundantes para la subversión de este proceso. En un escenario, la inhibición de la maduración del fagosoma y la fusión fagosoma-lisosoma está mediada por los esfuerzos de MAP, dirigidos a las membranas somales del fago. Por ejemplo, se propone que los lípidos micobacterianos se integran en las características estructurales y funcionales de las membranas del fagosoma y, por lo tanto, las alteran. Específicamente, se ha demostrado que un sulfolípidos micobacteriano es suficiente para perjudicar la fusión de fagosomas [43]. Las micobacterias también pueden influir en las características funcionales de la membrana del fagosoma a través de la secreción de la fosfatasa lipídica SapM. Durante el desarrollo del fagosoma, el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) es un lípido regulador esencial del tráfico de membrana que permite que el fagosoma adquiera constituyentes lisosomales [44]. En las células huésped infectadas con micobacterias muertas, PI3P funciona normalmente, pero en las células huésped infectadas con micobacterias vivas, PI3P se elimina de forma continua por la actividad de hidrólisis de SapM.

Es probable que este mecanismo sea utilizado por MAP ya que, según los resultados de NCBI-NR Blast, su genoma contiene una proteína fosfoesterasa muy similar en secuencia de aminoácidos a la SapM encontrada en *M. tuberculosis*.

### **3.5. Bloqueo de la capacidad de respuesta de los macrófagos**

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) son responsables de la percepción del desafío microbiano con la posterior inducción de respuestas protectoras del huésped. La activación de los PRRs se produce a través de la unión de patrones moleculares asociados (PAMPs). De patógenos específicos del receptor. Los receptores tipo peaje

(TLR) representan una subcategoría importante de PRR. Además de la inducción inmunitaria estándar y las respuestas de citocinas iniciadas por los diversos TLR, otros procesos celulares importantes para la patogénesis micobacteriana también están mediados por TLR, incluida la maduración fagosomal. Los individuos con mutaciones en el sistema TLR muestran una mayor susceptibilidad a una variedad de desafíos infecciosos, incluidas las micobacterias. Además los niveles dinámicos de expresión de TLR en respuesta a la infección natural de MAP implican un papel de este sistema en la protección contra MAP. El papel específico del sistema TLR en la defensa contra el MAP parece complejo. La activación de ciertos TLRs, como TLR9, parecen iniciar respuestas que son más críticas en la defensa contra MAP, mientras que la actividad de otros TLRs, como TLR2, inducen respuestas que suprimen la defensa inmune contra MAP.

### **3.6. TLR9.**

Si bien varios TLRs de mamíferos están involucrados en el control de la infección por micobacterias, TLR9 es de particular interés debido a su papel en la defensa natural, así como al potencial para el uso de agonistas de TLR9 como inmunoterapéuticos para las infecciones por micobacterias. TLR9 reconoce y se une al ADN microbiano identificado por la presencia de motivos CpG no metilados. En modelos de ratón, los oligodesoxinucleótidos (ODN) de CpG tienen valor en el tratamiento de infecciones por micobacterias y el pretratamiento de macrófagos humanos con ODN de CpG, pero no otros ligandos de TLR, promovieron el desarrollo de fagolisosomas e inhibieron el crecimiento de *M. Tuberculosis*.

Dado el papel demostrado de los TLRs, específicamente de los TLR9, en la defensa del huésped contra MAP, así como el potencial terapéutico de los agonistas de TLR9 en el tratamiento de infecciones por micobacterias. [15,16].

### **3.7. TLRs 1 y 2.**

El receptor tipo Toll 2 (TLR2), a través de la formación de heterodímeros con TLRs 1 y 6, tiene el potencial de unirse a una gama de PAMPs. Los polimorfismos de TLR2 se han asociado con una mayor susceptibilidad del ganado a la paratuberculosis. TLR2 se ha implicado en el reconocimiento de micobacterias a través de la unión de lipoproteínas de

la pared celular de bacterias. TLR2 es activado por el liparabinomano manosilado (Man LAM) para iniciar la señalización a través de la vía MAPK-p38. Un resultado primario de esta señalización es el aumento de la expresión génica de la interleucina (IL)-10. Se sabe que la IL-10 suprime las citocinas proinflamatorias, las quimiocinas, la IL-12 y la expresión del factor principal de histocompatibilidad de clase II. La inducción de la expresión de IL-10 a través de la señalización de TLR2 MAPK-p38 inducida por el hombre es un mecanismo primario por el cual MAP suprime las respuestas antimicrobianas de los macrófagos bovinos. De hecho, muchos de los efectos supresores de los macrófagos bovinos pueden replicarse exponiendo los monocitos bovinos a Man-LAM purificado. Por el contrario, los efectos subversivos de MAP sobre los macrófagos infectados pueden revertirse mediante la preincubación de células con anticuerpos neutralizantes anti TLR2. Este pretratamiento da como resultado un aumento de la acidificación del fagosoma, la maduración del fagosoma y la muerte de MAP. El hecho de que el tratamiento con anticuerpos anti-TLR2 no disminuya la concentración de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo indica que TLR2 tiene funciones independientes de IL-10 en la alteración de la acidificación y maduración de los fagosomas, por ejemplo, a través de la inhibición de EEA1 [18].

### **3.8. Señalización del interferón gamma.**

El IFN $\gamma$  desempeña un papel central en la defensa inmunitaria contra una variedad de patógenos intracelulares, incluidas las micobacterias. La señalización de IFN $\gamma$  induce una serie de respuestas bactericidas que incluyen la inducción de intermedios reactivos de oxígeno y nitrógeno, la producción de citocinas y la promoción de la maduración de los fagosomas. El IFN $\gamma$  activa las células diana uniéndose a un receptor de IFN $\gamma$  de alta afinidad para la activación de la vía del transductor de señales y activador de la transcripción (JAK-STAT) de la familia de las cinasas Janus. Los ratones con deficiencia de IFN $\gamma$  son más susceptibles a los patógenos intracelulares. Los seres humanos con mutaciones en las cadenas de receptores de IFN $\gamma$  experimentan infección por cepas micobacterianas ambientales de baja virulencia y sufren episodios recurrentes de tuberculosis. Múltiples estudios han destacado la importancia del IFN $\gamma$  para la patogénesis de la paratuberculosis. El ganado en la etapa subclínica produce niveles

aumentados de IFN $\gamma$  en los ganglios linfáticos ileales y cecales. Cuando las PBMC se aíslan de ganado afectado y se estimulan con antígenos MAP in vitro, muestran una mayor liberación de IFN $\gamma$  que la observada en células de ganado no infectado. Además, observamos un aumento de la producción de IFN $\gamma$  específico de MAP por parte de las células Ln entéricas dentro de un mes después de la infección por MAP. Por lo tanto, la producción de IFN $\gamma$  parece ser una respuesta temprana a la infección por MAP y esta respuesta continúa a lo largo de una infección persistente. [19,20].

### **3.9. Superóxido dismutasa.**

La actividad bactericida del fagolisosoma maduro se ve reforzada mediante la producción de moléculas químicas reactivas, incluidos los intermedios reactivos del oxígeno, como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales libres hidroxilos. Si bien estas especies reactivas están asociadas con la muerte de micobacterias, existe controversia sobre el grado en que las ROI contribuyen a la destrucción de MAP intracelular. Específicamente, mientras que los monocitos bovinos generan aniones superóxido en respuesta a la estimulación con una serie de estimulantes, se produce muy poco retorno de la inversión en respuesta a la infección por MAP o a la estimulación por IFN- $\gamma$  de monocitos infectados con MAP. Estas observaciones pueden interpretarse como evidencia de que los ROI son ineficaces contra el MAP y, por lo tanto, no son activados por el huésped. Por el contrario, los ROI pueden representar una amenaza significativa para MAP y, por lo tanto, MAP ha evolucionado para subvertir una importante defensa del hospedero. MAP tiene la capacidad de secretar superóxido dismutasa, que neutraliza los radicales superóxido, lo que sugiere que puede haber una ventaja en la neutralización de esta defensa del huésped [10,11].

### **3.10. Óxido nítrico.**

El duro entorno del fagolisosoma incluye la producción de otro grupo de moléculas antimicobacterianas, los intermedios reactivos de nitrógeno (RNI). Al igual que los ROI, existe controversia en cuanto a la contribución de los RNI a la defensa del huésped contra diferentes micobacterias en diferentes especies. En los macrófagos de ratón, la producción de óxido nítrico inducida por IFN- $\gamma$  está directamente relacionada con la capacidad de matar una serie de micobacterias, incluidas M. tuberculosis, MAP y M.

leprae. Además, la inhibición química de la producción de óxido nítrico aumenta la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos de ratón [90]. La relevancia de las RNIs para la paratuberculosis está respaldada por la capacidad de los monocitos bovinos infectados con MAP para aumentar la producción de óxido nítrico en respuesta a la estimulación del IFN- $\gamma$  [1,2,3].

### **3.11. Apoptosis**

Existe un consenso general de que MAP influye en las tendencias apoptóticas de los macrófagos bovinos, pero con opiniones contradictorias sobre si esto es de manera pro- o anti-apoptótica. Sin embargo, puede ser inapropiado clasificar MAP como pro- o anti-apoptótica. En cambio, en diferentes situaciones, o en diferentes etapas del ciclo de infección, MAP puede asumir cualquiera de estos roles. Por ejemplo, se ha demostrado que las cepas virulentas de *M. tuberculosis* posponen inicialmente la apoptosis para permitir la replicación intracelular temprana, y luego inducen la muerte celular necrótica para salir de la célula cuando las condiciones intracelulares no suelen favorecer el crecimiento.

Desde la perspectiva del huésped, la apoptosis de las células infectadas sirve para eliminar el patógeno. La apoptosis, pero no la muerte necrótica de los macrófagos infectados con micobacterias, induce la muerte intracelular de los bacilos. Además, las células inmunitarias infectadas con MAP que sufren apoptosis son fagocitadas por macrófagos sanos, lo que proporciona al sistema inmunitario del huésped la oportunidad de limitar un mayor crecimiento de MAP [94]. Sin embargo, este proceso puede ser un medio para propagarse a macrófagos sanos mientras permanece oculto a la vigilancia inmediata, limitando la respuesta inflamatoria. La apoptosis de macrófagos infectados también proporciona la oportunidad de presentar antígenos MAP para guiar las respuestas inmunitarias adaptativas a través de un proceso asociado con macrófagos y neutrófilos, distinto de la apoptosis mediada por el receptor Fc. La apoptosis de los macrófagos infectados con MAP también limita la inflamación aguda y el daño tisular que suele producirse con la liberación de moléculas quimiotácticas tras la lisis celular.

Desde la perspectiva de MAP, el establecimiento de una infección persistente depende de su capacidad para infectar nuevos macrófagos antes de la activación de sus defensas

antimicrobianas. Por lo tanto, el microambiente local en el que se libera MAP de las células huésped infectadas puede ser crítico. La liberación de MAP de las células apoptóticas o la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos infectados con MAP pueden ser un mecanismo para evitar la inflamación y la activación de los macrófagos no infectados. Un entorno protegido dentro de los macrófagos proporciona un refugio ideal para la replicación, pero para mantener una infección persistente es fundamental que los macrófagos adyacentes también proporcionen un sitio apropiado para una mayor replicación.

### **3.12. MAP promueve la apoptosis de macrófagos infectados**

Varias investigaciones indican que la infección por MAP de los macrófagos promueve la apoptosis. Esto parece ser un esfuerzo activo por parte de las bacterias, o el resultado de una respuesta de los macrófagos a las bacterias vivas, ya que eliminar MAP por calor inducen significativamente menos apoptosis. Periasamy et al. no informaron de cambios en la muerte de los macrófagos con los MOI MAP bajos (MOI=1), pero se observó apoptosis dependiente de caspasas en los MOI más altos (MOI=10), con apoptosis y necrosis independientes de las caspasas y el óxido nítrico en los MOIs más altos (MOI=50). Estas observaciones se interpretaron como evidencia de que el daño mitocondrial inicia procesos de muerte celular en macrófagos infectados con MAP. Un cambio en los mecanismos que median la apoptosis en diferentes MOI puede ser paralelo a los eventos que ocurren durante la infección natural.

### **3.13. MAP inhibe la apoptosis de los macrófagos infectados**

Se ha sugerido que la supresión de la apoptosis de los macrófagos puede ser fundamental para la estrategia de evasión inmunitaria empleada por MAP y otras micobacterias. Los macrófagos infectados se someten a apoptosis por varias razones, una de las cuales puede ser facilitar una presentación más eficiente de los antígenos bacterianos al sistema inmunológico. Por lo tanto, MAP puede inhibir la apoptosis no sólo para permitir más tiempo para la replicación bacteriana, sino también para disminuir la detección por parte del sistema inmunitario. Los macrófagos infectados con MAP son más resistentes a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, normalmente un inductor de la apoptosis de macrófagos. Un mecanismo por el cual MAP inhibe la apoptosis es mediante la reducción de la expresión de los genes caspasa 3/7 y 8, lo que resulta en una disminución de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9. Además, al inducir la secreción de IL-10 por macrófagos, las micobacterias patógenas también pueden limitar la apoptosis, ya que la IL-10 inhibe la expresión de TNF $\alpha$  y aumenta la liberación de TNFR2 soluble para neutralizar la actividad de TNF $\alpha$ . El Man-LAM también se ha implicado en la regulación de la apoptosis al prevenir un aumento en la concentración de calcio citosólico. El calcio citosólico mata la apoptosis al aumentar la membrana mitocondrial por permeabilidad, lo que resulta en la liberación de productos proapoptóticos.

Man-LAM también estimula la fosforilación de Bad, una proteína proapoptótica que evita que la molécula se una a proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2. El Bcl-2 libre evita la liberación de citocromo c de las mitocondrias. La señalización pro-supervivencia en el tejido infectado con MAP fue más pronunciada en los animales, desarrollando respuestas tempranas de anticuerpos a los antígenos MAP, pero no las típicas respuestas inmunitarias mediadas por células asociadas con la eliminación de MAP.

### 3.14. IL-10.

La citocina IL-10 es producida por monocitos, macrófagos y linfocitos B y T. La IL 10 reduce la expresión de IL-12, suprimiendo así las respuestas inmunitarias de tipo Th1. La IL-10 también inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y disminuye la presentación de antígenos por parte de los macrófagos y las células dendríticas. Todos estos efectos, como se ha discutido en otras partes de esta revisión, tienen el potencial de mejorar la supervivencia de MAP dentro de los macrófagos. Weiss et al. informaron que MAP en la infección resultó en una expresión aún mayor de IL-10 que la especie bacteriana estrechamente relacionada *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. En un estudio posterior, al neutralizar la IL-10 producida por macrófagos infectados con MAP se observó un aumento en: la expresión de TNF $\alpha$ , IL-12, IL-8, MHC-II; acidificación de fagosomas; apoptosis de macrófagos; y la producción de óxido nítrico. Se sabe que cada uno de los anteriores mejora la eliminación inmunitaria de MAP; y, de hecho, el 57% de las bacterias MAP murieron dentro de las 96 horas posteriores a la infección con neutralización de IL-10. La comprensión de los mecanismos por los cuales MAP aumenta la secreción de IL-10 de los macrófagos proporcionará información sobre las estrategias de evasión inmunitaria que contribuyen a una infección persistente. Esta información también puede proporcionar la base racional para desarrollar una cepa vacunal atenuada que induzca una inmunidad protectora sin riesgo de infección persistente.

### 3.15. MCP-1

Las quimiocinas son una familia de pequeñas proteínas señalizadoras con un pequeño peso molecular de 8 a 14 kDa secretadas por las células del sistema inmunitario [0=88, 1=89]. Se trata de citocinas quimiotácticas encargadas de regular el movimiento de otras células en respuesta a un estímulo químico (quimiotaxis), de ahí su nombre quimiocinas. La familia de quimiocinas se caracteriza en cuatro familias con dos subgrupos principales (CXC y CC) y dos subgrupos pequeños (CX3C y C). Esta clasificación se basa en términos generales en la presencia de los aminoácidos cisteína cerca del extremo N-terminal. El ligando de quimiocina-2 (CCL2) de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)/CC (CCL2) pertenece a la familia CC que tiene cisteínas unidas estrechamente al extremo N-terminal. Los residuos de cisteína están unidos por un puente disulfuro entre la primera y la tercera cisteína y entre la segunda y cuarta cisteína. Los otros MCP que se encuentran en humanos además de MCP-1 son MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7) y MCP-4 (CCL13) que comparten aproximadamente el 60% de homología.

Todos los receptores de quimiocinas son siete receptores acoplados a proteínas G transmembrana que pertenecen a la familia de receptores de rodopsina o serpentina. El MCP-1 puede unirse a varios receptores, pero principalmente refuerza su efecto biológico al unirse a la región extracelular de CCR2. Se ha informado que el dominio amino terminal de CCR2 es necesario y adecuado para la unión a MCP-1. La mutación en los residuos de cisteína del dominio N-terminal conduce a la pérdida de la afinidad de unión a MCP-1 [88]. El análisis mutacional dirigido al sitio de CCL2 ha implicado la importancia de dos regiones de estructura primaria para la actividad biológica. Una región es el aminoácido 10-13, donde la mutación disminuyó la actividad biológica; la otra región es el aminoácido 34-35, donde la mutación causó la pérdida completa de la actividad de MCP-1 [87,88].

Las principales fuentes de proteína quimioatrayente 1 de monocitos (MCP-1) son las células epiteliales, las células endoteliales, las células musculares lisas, los monocitos/macrófagos, los fibroblastos, los astrocitos y las células microgliales que están reguladas por varias citocinas y factores [7-9=94-96]. Dirigen la migración e infiltración de monocitos, microglía, linfocitos T de memoria en el lugar de la lesión y la infección en

diversos trastornos. El papel de MCP-1 se ha implicado en la patogénesis de diversas enfermedades en las que contribuye mediante numerosos mecanismos. Aquí se explica y se han seleccionado algunas condiciones patológicas donde se ha encontrado la expresión de MCP-1 predominantes. [88]

MCP-1 en la quimiotaxis de monocitos: MCP-1 provoca el inicio simultáneo de diferentes caídas de signos, su efecto sobre la quimiotaxis de monocitos podría ser extraordinario. De esta manera, la migración de las células monocíticas es presumiblemente dependiente de p38 MAPK y Src-cinasas, mientras que la reacción transitoria está básicamente conectada con PI3K y p42/44ERK1/2 MAPKs. Las distinciones en la información relativa a las vías de señalización de las MAPKs instigadas por MCP-1 y su papel en la quimiotaxis podrían aclararse por la forma en que las reacciones celulares que se producen debido a la quimiocina dada pueden cambiar significativamente dependiendo del tipo de célula en la que se formaron. Esto podría deberse a la accesibilidad distintiva de ciertas subunidades de proteína G u otras sustancias intermedias en varios tipos de células. Algunos informes demuestran que MAPK p38 está implicado en la reubicación de monocitos mediados por MCP-1. Se mostró que la quimiotaxis intervenida por MCP-1 fue reprimida por el inhibidor de p38, mientras que la restricción de MAPK de p42/44EKR1/2 fue incapaz. [86,88]

MCP-1 se ha asociado con estrés oxidativo en varios estudios. Los ratones deficientes en MCP-1 han demostrado producir menos moléculas relacionadas con el estrés oxidativo (ROS intrahepáticas y HNE), por lo tanto, protegen del daño y avanzan el estrés oxidativo en el modelo de lesión hepática aguda grave. El tratamiento de células HK-2 y células mononucleares de sangre periférica humana (HPBMC) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la inducción de estrés oxidativo, mejoró la expresión de MCP-1 y otras citocinas proinflamatorias. En el estudio de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), se ha informado que el daño oxidativo aumenta la concentración de fosfolípidos oxidativos y regula la secreción de MCP-1 en las células de la retina. La contribución de MCP-1 en la producción de ROS se ha confirmado en la alteración metabólica inducida por ovariectomía en ratones, donde la deficiencia de MCP-1 atenuó los niveles elevados de ROS y el estrés oxidativo. [88]

La expresión de MCP-1 escalada mediada por la activación de NF-Kb y el estrés oxidativo se ha demostrado en riñón de rata durante la lesión por isquemia/reperfusión. Otro estudio con sulfato de indoxilo (factor de riesgo para EVC y ERC) ha demostrado que regula al alza la expresión de MCP-1 a través de la activación de NF-kB inducida por estrés oxidativo en células endoteliales vasculares. [88]

MCP-1 en las respuestas inmunitarias. MCP-1 al unirse a sus receptores CCR2 activa células como los monocitos y otras células inmunitarias que promueven la inflamación. Dirige la infiltración de leucocitos y efectúa la proliferación de las células T y la función inmunitarias. A diferencia de otras quimiocinas que desencadenan el tipo de fenotipo Th1, MCP-1 actúa como regulador en la polarización de las células Th0 hacia un fenotipo Th2. T1 y T2 ambas respuestas pueden ser promovidas por MCP1 in vivo, lo que depende de algunos factores adicionales (tiempo de inducción de MCP-1, sitio del tejido, tipo de patógeno) como se informó en un estudio. MCP-1 regula la diferenciación de monocitos en células dendríticas. Modifica la respuesta inmune Th1 suprimiendo selectivamente la diferenciación de las células T naive en células efectoras Th1 mediante la regulación de la capacidad de liberación de IL-12 de las células dendríticas. MCP-1 está implicado en la producción de citocinas Th naive. La producción de IL-4 por parte de las células T aumenta ya que MCP-1 puede activar el promotor de IL-4, lo que resulta en la mejora de la respuesta inmune de tipo 2. Se ha sugerido que MCP-1 producido por neutrófilos en un microambiente Th1 está involucrado en las respuestas adaptativas Th1.[85,88]

Independientemente del doble papel de MCP-1 en las enfermedades infecciosas, nuestra comprensión de cómo se controla la quimiocina a lo largo de la infección es limitada. Los niveles séricos altos de MCP-1 se identifican durante el período intenso de la infección en humanos y animales de laboratorio y se correlacionan con el período virémico. Recientemente se ha propuesto que el incremento de MCP-1 estimulado por IFN $\beta$  puede contribuir a la inhibición mediada por MCP-1 de la expresión de CCR2 y, posteriormente, disminuir la capacidad de respuesta de los monocitos a esta quimiocina. Los efectos antibacteriales de MCP-1 parecen estar mediados por la regulación de la producción de IFN-g, al igual que por la estimulación del reclutamiento de monocitos y DC en las vías respiratorias. Además, se descubrió que MCP-1 y CCR2 son importantes para controlar

la dispersión de *B. mallei* desde los pulmones a destinos extrapulmonares después del inicio de la infección neumónica. [88]

Durante un examen relacionado con la parte de investigación de MCP-1 en la mejora de la colitis inducida por haptenos, no tiene suficiente MCP-1. Esto se asoció con una regulación a la baja de la actividad de la mieloperoxidasa, IL-1, IL-12p40 y la producción de IFN- $\alpha$  y macrófagos en la mucosa colónica. Del mismo modo, los resultados notaron cantidades más bajas de células EC que expresan 5-HT en el colon de ratones deficientes en MCP-1 en comparación con las de los ratones de tipo salvaje después del ácido dinitrobenceno sulfónico. Estos resultados demuestran el papel crítico de MCP-1 en el desarrollo de la inflamación colónica en este modelo en el contexto de las células endocrinas inmunitarias y entéricas. Los modelos de infección pulmonar mediada por hiperoxia y peritonitis séptico han revelado que el tratamiento con anticuerpos anti-MCP-1 minimiza la penetración de los leucocitos en los pulmones y el peritoneo de forma independiente. [87,88]

Hasta ahora, los estudios han sugerido que los tratamientos anti-MCP-1 son esencialmente una disminución de la penetración de los macrófagos en los pulmones después de la infección por el virus de la gripe. El bloqueo de MCP-1 disminuye la población de neutrófilos y el nivel de MPO en el lavado broncoalveolar. Además, MCP-1 estimula el reclutamiento pulmonar de células CD81T que son esenciales en la defensa del huésped contra la infección viral. Por lo tanto, la disminución del reclutamiento de células T CD81 dependientes de MCP-1 también puede aumentar los efectos patológicos observados. [88]

Con la posible implicación de MCP-1 en diversas condiciones patológicas, muchas investigaciones también indican que MCP-1 puede ser una herramienta para el diagnóstico del nivel de inflamación en muchas enfermedades. MCP-1 actúa como marcador diagnóstico en enfermedades urinarias, como la nefritis lúpica, donde el nivel de MCP-1 urinario se eleva en comparación con los sujetos de control. La determinación de la concentración de MCP-1 en orina es un método fiable y no invasivo para la nefritis lúpica debido a su actividad inflamatoria [142]. La proporción de MCP-4/MCP-1 en plasma también es un biomarcador diagnóstico circadiano para el trastorno de estrés

postraumático crónico porque la hipótesis sugiere que las citocinas proinflamatorias y las quimiocinas en plasma podrían ser mediadores de los mecanismos psicofisiológicos que relacionan los cambios en el comportamiento y el trastorno de salud mental y la morbilidad médica [143]. MCP-1 también actúa como marcador diagnóstico en la fibrosis hepática asociada con el trastorno mieloproliferativo transitorio en el síndrome de Down. [88].

### III. JUSTIFICACIÓN

La primera respuesta de un organismo a los patógenos es una reacción inflamatoria, caracterizada por la migración de tipos celulares con funciones defensivas, alteraciones en la permeabilidad vascular y la secreción de medios solubles, como citocinas, quimiocinas e interferones [IFN]. Las células inflamatorias y los mediadores solubles tienen una potente actividad antimicrobiana y, juntos, representan la fase efectora de la resistencia innata. La activación de la respuesta inflamatoria/innata no es específica del patógeno, pero depende de la unión del ligando a los receptores codificados por la línea germinal (receptores de reconocimiento de patrones) que reconocen patrones moleculares que se conservan entre grandes clases de patógenos microbianos y son compartidos por ellas.

La proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* (MAP) está relacionada con la regulación de la homeostasis del hierro, la cual es crucial para la supervivencia de la bacteria en entornos donde el hierro es limitado, como dentro de los macrófagos. Esta proteína actúa como un regulador de la captación de hierro, similar a la familia de reguladores Fur (Ferric Uptake Regulator), que son esenciales para la adaptación y patogenicidad bacteriana.

MAP3773c ha sido descrita como una proteína tipo Fur, con dos sitios de unión a metales, uno de ellos coordinando zinc estructural, lo que sugiere su papel en la regulación de genes involucrados en el estrés oxidativo y la adquisición de hierro. En condiciones de privación de hierro, esta proteína modula genes asociados con la biosíntesis de ácidos grasos y la formación de la pared celular, afectando la virulencia y la capacidad de la bacteria para sobrevivir en el huésped.

Justificar su papel en la inhibición de la respuesta inflamatoria puede estar relacionado con su capacidad de alterar la síntesis de componentes celulares clave, como ácidos grasos y polisacáridos, que impactan la estructura de la pared celular y la respuesta inmune del huésped. La inhibición de estas rutas podría disminuir la activación de los mecanismos inmunitarios del huésped, lo que permite a MAP evadir el sistema inmunológico y establecer infecciones crónicas.

## **IV. HIPOTESIS**

Hipótesis general.

“La proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* inhibe la respuesta inflamatoria del huésped al modular la homeostasis del hierro, lo que contribuye a la evasión del sistema inmune”.

Hipótesis específica.

MAP3773c no interviene en la expresión de citocinas proinflamatorias como MCP-1”.

## **V. OBJETIVOS GENERALES**

Determinar el papel de la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en la modulación de la respuesta inflamatoria del huésped mediante la evaluación de los niveles de MCP-1 en la línea celular J774A.1 utilizando la técnica de ELISA.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cultivar y transformar una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c
2. Purificación del plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c de las células *Escherichia coli* BL21 (DE3) / pcDNA 3.1-MAP3773c.
3. Cuantificación del plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c mediante espectrofotometría ultravioleta-visible.
4. Confirmación del inserto del gen map3773c clonado en pcDNA3.1 a partir de la clona 8 de E. Coli BL21 (DE3).
5. Crecer, establecer y propagar la línea celular continua J774A.1 de macrófagos de ratón.
6. Realizar transfección celular de la línea celular continua J774A.1 de macrófagos de ratón con el plásmido PCDNA 3.1-MAP377c.
7. Cuantificar los niveles de MCP-1 de la línea celular J774A.1 estimuladas con el plásmido pcDNA 3.1 con el gen MAP3773c utilizando la técnica de ELISA.
8. Procesamiento de datos, analizar la correlación entre la expresión de MCP-1 en la modulación de la respuesta inflamatoria.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### 7.1. Cultivar crio viales en glicerol de una cepa de *Escherichia coli* con el plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c

Se utilizó para purificar el plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c (*Invitrogen TM*) una cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) clonado por la M.C. Dulce Liliana Dueñas Mena, en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Campus Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California.

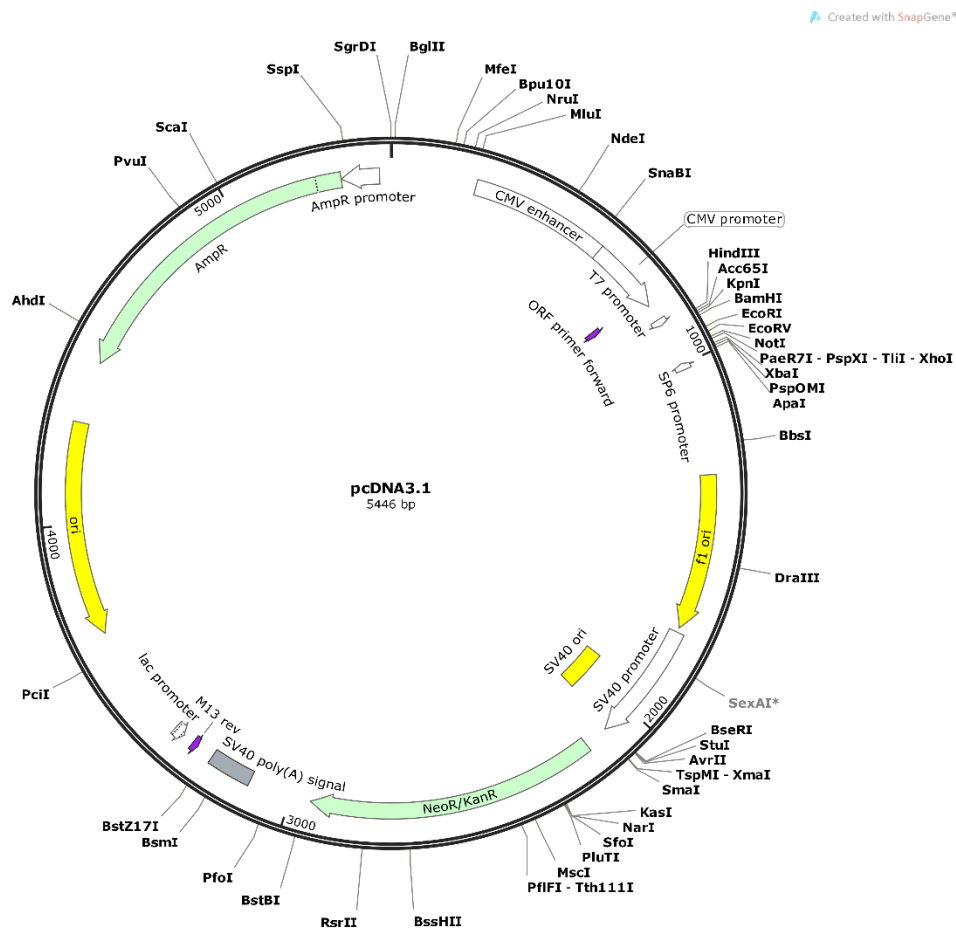


Figura 7. Mapa del plásmido pcDNA 3.1 de invitrogen TM

1. Se tomó un cultivo líquido de la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c para conservar y mantener plásmidos en 15 mL de caldo Luria Bertani (LB) (NaCl 5.0 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L, triptona 10.0 g/L, pH 7.5 ±0.2) con una concentración final de 1 µL/mL de ampicilina, durante toda la noche a 37 °C con una agitación constante de 200 rpm.
2. Se realizó una resiembra del cultivo, en cajas Petri con medio sólido LB estéril con una concentración final de 1 µL/mL de ampicilina, durante toda la noche a 37 °C.
3. Se identificaron bacterias/colonias transformadas con el plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c para realizar una resiembra en cultivo líquido en 15 mL de caldo LB con una concentración final de 1 µL/mL de ampicilina, durante toda la noche a 37 °C con una agitación constante de 200 rpm.
4. Se centrifugaron los cultivos líquidos a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Se elimina el sobrenadante con pipeta Pasteur), la biomasa se congela a -20 °C

## **7.2. Purificación del plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c**

1. Se descongelaron 1.7 g de biomasa celular en hielo molido y se resuspendió en 1 mL de GTE [50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl y 10 mM EDTA], durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Se añadió 2 mL de la solución NaOH/SDS [0.2 N NaOH y 1% SDS], se mezcla cuidadosamente por inversión y se deja reposar por 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añadió 1.5 mL de la solución 5M Kac [5M Kac, Hac glacial y H<sub>2</sub>O destilada] se mezcla en vortex durante 2 segundos o por inversión.
4. Se dejó en hielo molido durante 15 a 20 minutos.
5. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos (en tubos Corex) para precipitar el debris celular y DNA cromosomal bacteriano.
6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se recentrifugó. Se le añadió 9 mL (2 volúmenes) de Etanol absoluto y se dejó 1 hora a -20 °C y/o se deja durante toda la noche para precipitar el DNA plasmídico.

7. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para precipitar DNA plasmídico y RNA. Se elimina el sobrenadante.
8. Se lavó con 10 mL de etanol al 70%, se centrifuga en las mismas condiciones y se deja secar el pellet formado.
9. Se le añadió 300  $\mu$ L Buffer TE + 3  $\mu$ L Rnasa (100  $\mu$ g/mL). Se Aseguró que el pellet formado se disolvió y posteriormente se transfirió a tubos Eppendorff de 1.5 mL.
10. Se incubaron los tubos Eppendorf a 37 °C durante 30 minutos.
11. Se le añadió un volumen igual de Fenol/Cloroformo/Isoamilalcohol (50/49/1). Posteriormente se agitó en vortex el tiempo necesario.
12. Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Se tomó la fase superior acuosa en un nuevos tubos Eppendorf.
14. A los nuevos tubos Eppendorf se les añadió 30  $\mu$ L (1/10 vol.) 5M Kac + 600  $\mu$ L (2 Vol) Etanol absoluto.
15. Sí la solución apareció turbia se incuba durante 5 a 10 minutos a -20°C; si aparece clara a 1 hora a -20°C.
16. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
17. Se elimina el sobrenadante y se lava el pellet con 500  $\mu$ L de etanol al 70%.
18. Por último el pellet formado se disuelve en 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se congela a -20°C.

### 7.3. Cuantificación del plásmido pcDNA 3.1-MAP3773c mediante espectrofotometría ultravioleta-visible.

1. Se midió la concentración del plásmido obtenido después de la extracción y purificación, y se midió utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S Vis, realizando lecturas a 260/280 nm.
2. Diluir si es necesario hasta obtener una concentración de 1 µg/µL.

### 7.4. Confirmación del inserto del gen map3773c, clonado en pcDNA 3.1 a partir de la clona 8 de E. Coli BL21 (DE3)

La confirmación de la inserción de un fragmento de ADN en el plásmido pcDNA3.1 puede realizarse mediante una digestión enzimática utilizando las enzimas de restricción Hind III y EcoRI. Estas enzimas reconocen secuencias específicas dentro del plásmido y permiten verificar la presencia y orientación del inserto mediante análisis en gel de electroforesis.

Se mezcló suavemente la reacción y se centrifugó brevemente, se dejó incubar a 37°C por 1-2 horas. En la tabla 1 se observa la cantidad de la mezcla de reactivos para llevar a cabo la digestión enzimática.

**Tabla 1. Mezcla de reactivos de la digestión enzimática.**

Reactivos	Volumen para 1 reacción
Enzima Eco RI	2 µL
Enzima Hind III	2 µL
Buffer de corte 10X	2 µL
Agua grado biología molecular	9 µL
ADN plásmidico pcDNA3.1 con inserto MAP3773c	5 µL
<b>Total</b>	<b>20 µL</b>

El ADN plasmídico después de ser digerido se corrió en una electroforesis en gel de agarosa, para observar la correcta digestión de los plásmidos recuperados, en la electroforesis de la digestión enzimática se procedió a correr 20 µL de la mezcla de reacción con 5 µL de búffer de cargar 6X y marcador de peso molecular de 1 kb en una electroforesis en gel de agarosa al 2.0% con bromuro de etidio en presencia de búffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), a 100 Volts, durante 30 – 45 minutos.

En el apartado de resultados en el punto 8.2. se puede observar con mas claridad las bandas esperadas, se utilizaron como controles los siguientes. Control negativo; el plásmido sin inserto para comparar la digestión, Control sin digestión; el plásmido sin tratamiento enzimático para verificar su integridad y control de inserto puro; Se dispuso del inserto solo, para comparar el tamaño con respecto al inserto digerido.

#### **7.5. Crecimiento y propagación de la línea celular continua J774A.1 de macrófagos de ratón.**

1. Como primer paso fue descongelar un criovial de células congeladas de la línea celular continua J774A.1 Re suspendidas en DMSO. [El vial contendrá 1,000,000 de células Re suspendidas en 1 mL de DMSO].
2. El criovial se pone en un baño maría a 37°C hasta observar que casi por completo se descongele.
3. Se prepara un tubo cónico de 15 mL estéril y se le añaden 4.5 mL de medio DMEM/BAJO GLUCOSA, + 4.00 mM L-Glutamina, + 1000 mg/L Glucosa, + 110 mg/L Piruvato de sodio (*Cytivia*). al medio de cultivo se le añadieron los antibióticos Gentamicina 20mg/mL (*HyClone*), Solución de penicilina – estreptomycin [10,000 unidades/mL penicilina/10,000 µg/mL estreptomycin] (*HyClone*), Suero fetal bovino al 10% (FBS, *HyClone*) ajustado a un pH de 7.3 ± 0.1
4. Se procesa el criovial descongelado inmediatamente y posteriormente se adiciona todo el contenido del vial en el tubo cónico de 15 mL con medio preparado/acondicionado previamente.
5. Se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

6. El sobrenadante se descarta y se adiciona nuevamente medio de cultivo preparado/acondicionado.
7. Se mezcla suavemente hasta disolver el pellet formado.
8. Se vuelve a repetir el proceso desde el paso numero 5 con las mismas condiciones.
9. Se homogeniza el tubo cónico acondicionado y se adiciona a cajas T25 y T75 acondicionadas y preparadas en las mismas condiciones como el en paso número 3.
10. Ya en las cajas T25 y T75 se homogenizan las células con el medio acondicionado/preparado.
11. Se incuban las cajas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 a 3 horas, las células se observan en un microscopio invertido (*LEICA\_DMi1, Leica*) después de las 2 horas para determinar si el procedimiento anterior se realizó en buenas condiciones.
12. Pasadas las 3 horas se decanta el medio preparado/acondicionado y se realizan de 1 a 2 lavados con PBS 1x; para la caja T75 se añaden 10 mL de PBS 1x, para la caja T25 se añaden 4 mL de PBS 1x para eliminar a restos celulares de células muertas o células que no se lograron adherir a la matriz extracelular.
13. Por último añadir iguales cantidades de medio preparado/acondicionado a las cajas T25 y T75, descritos en el paso anterior.
14. Las cajas se guardan e incuban a 37°C en condiciones atmosféricas de 5% de CO<sub>2</sub> hasta su nuevo uso y mantenimiento.

## **7.6. Transfección celular de la línea celular continua J774A.1 de macrófagos de ratón con el plásmido pcDNA3.1-MAP377c con el reactivo de transfección TurboFect.**

1. Una vez que las cajas T25 hayan tenido una confluencia del 80% al 90%, se procede a utilizar raspadores de células (cell scrapers) para recolectar y contabilizar la cantidad de células vivas y muertas que existen en el medio de cultivo.
2. Las células se contabilizan en cámara de Neubauer con una solución de azul de tripan al 0.4%. Para contar a las células se añaden 5  $\mu$ L de muestra + 5  $\mu$ L sln de tripan al 0.4% (1:1), se mezcla y se observa al microscopio para comenzar a contabilizar.
3. La cantidad de células vivas que existan en el medio serán usadas para realizar las transfecciones con el plásmido pcDNA3.1-MAP3773c de acuerdo al diseño experimental establecido.
4. Para el diseño experimental establecido se transfectaron una cantidad de  $4 \times 10^6$  células en tubos cónicos de 15 mL con medio acondicionado/preparado en hielo molido.
5. En otro tubo cónico de 15 mL se acondiciono y añadió 180  $\mu$ L de plásmido pcDNA3.1-MAP3773c y 1.8 mL de medio de cultivo preparado/acondicionado y por último se agregó 108  $\mu$ L del reactivo de transfección TurboFect, para generar el complejo de transfección. Se dejo incubando los complejos de transfección durante 10 minutos.
6. Una vez generado el complejo de transfección este se añadió a las células con ligeros pipeteos y se deja incubar durante 15 minutos.
7. Una vez generado la transfección de las células, estas se colocaron en nuevas cajas T25 acondicionadas con medio preparado/acondicionado.
8. Las cajas en donde se realizó los experimentos se guardan e incuban a 37°C en condiciones atmosféricas de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 y 48 horas.

### **7.7. Cuantificación de los niveles de MCP-1 en la línea celular J774A.1 transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 – map3773c por la técnica de ELISA.**

En esta sección se presentan las condiciones de los experimentos realizados para evaluar los niveles de MCP-1 en los diferentes grupos experimentales en comparación con los tratamientos realizados en 24 y 48 horas.

El tratamiento 1 funcionó sin transfectar y sin antibiotico por lo tanto se tomó como el estado basal (blanco) de la línea celular J774A.1; durante el experimento de 24 y 48 horas.

El tratamiento 2 fue en el que se realizó la transfección celular con lipofectamina y con el vector de expresión pcdna3.1 de map3773c para observar la funcionalidad de la proteína recombinante durante el experimento de 24 y 48 horas con neomicina (400 mg/mL)

El tratamiento 3 se realizó la transfección celular con lipofectamina y con el vector de expresión pcdna3.1 con neomicina (400 mg/mL) para observar la funcionalidad del vector de expresión pcdna3.1, la cantidad de células que lograron aceptar el vector de expresión con lipofectamina durante 24 y 48 horas. Además de observar la viabilidad celular, observar que cantidad de células sobreviven y observar el nivel de expresión de MCP-1.

El tratamiento 4 se utilizó únicamente neomicina (400 mg/mL) para observar la viabilidad celular, observar que cantidad de células sobreviven durante el experimento y observar el nivel de expresión de MCP-1 sin haber realizado la transfección celular con el vector de expresión pcdna 3.1 durante 24 y 48 horas.

El tratamiento 5 se realizó la transfección celular con lipofectamina y con el vector de expresión pcdna3.1 map3773c, con neomicina (400 mg/mL) y con FeNTA (400 uM) para observar la funcionalidad de la proteína observar que cantidad de células sobreviven durante el experimento y observar el nivel de expresión de MCP-1. Durante 24 y 48 horas.

Se observo que los tratamientos experimentales 2 de 24 horas y 2 de 48 horas, presentan niveles significativamente menores de MCP-1 en comparación con el control experimental 1 positivo, el grupo de controles experimentales negativos 3, 4 y 5 muestran

una gran diferencia significativa con respecto al control 1, por lo que existe unas diferencias significativas entre el grupo de controles negativos utilizados con respecto al único control positivo que se utilizó.

En detalle, los tratamientos 2 de 24 horas y 2 de 48 horas experimentales, alcanzaron niveles menores al control 1, que es menor que nuestro control. Similarmente el grupo de controles negativos mantuvieron valores debajo de nuestro control 1, a excepción de nuestro control 3 que mostro un incremento mayor al promedio de los tratamientos experimentales.

Estos hallazgos sugieren que nuestro tratamiento experimental 2 de 24 horas y 2 de 48 horas son significativamente afectados por los tratamientos experimentales aplicados al grupo de tratamientos experimentales negativos 3, 4 y 5. Mientras que el control 5 no muestra un impacto notable puesto que el control 1 funciona como el estado basal (blanco) de la línea celular J774A.1. [89-91].

Los sobrenadantes de cultivo se recogieron de macrófagos tratados con cada estimulante utilizando un vector plásmido pCDNA3.1 MAP3773c. Se realizo el test Mouse MCP-1 Platinum ELISA para detectar las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo según lo recomendado por el fabricante (Invitrogen). Las placas se leyeron en un lector de absorbancia de microplacas (BIO-RAD, ¡Mark). A 450 nm. Una cantidad menor que el valor de corte inferior para cada citocina se consideró como cero. Cálculo de la curva estándar para cada citocina, valores de MCP-1

## **7.8. Procesamiento de datos.**

Una vez obtenidos los análisis por duplicado de la expresión de MCP-1 los resultados fueron procesados en el programa Excel 2021, para correlacionar los datos obtenidos y generar con ello los resultados, gráficos y conclusiones que contribuyan a comprender los datos obtenidos durante los diseños experimentales utilizando la desviación estándar y regresión lineal durante el procesamiento de los datos obtenidos.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Concentración de plásmidos purificados pCDNA 3.1 map3773c.

Lo siguiente fue realizar la cuantificación de los plásmidos para determinar la concentración que se utilizará durante los experimentos, se extrajeron alícuotas del plásmido preparado para la transfección. Se midió la concentración del plásmido PCDNA 3.1 con el gen de map3773c.

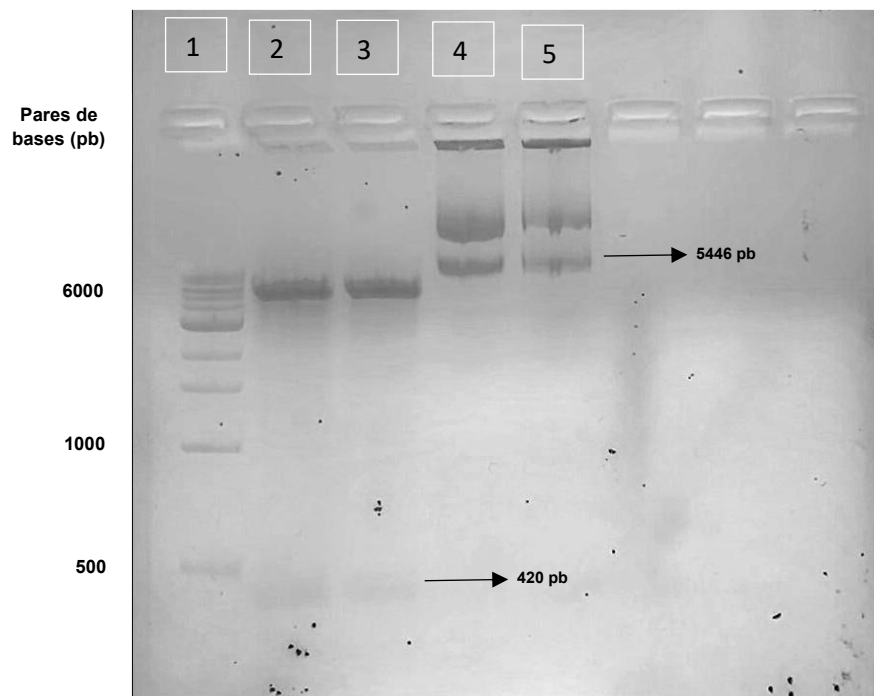
Se determino la concentración de los plásmidos mediante la relación A260/A280, dándonos las siguientes concentraciones.

*Tabla 2. Concentraciones de plásmidos purificados.*

<b>Muestra</b>	<b>Abs (A260/A280) nm</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>
<b>1. pCDNA 3.1 map3773c</b>	<b>2.438</b>	<b>121.9 µg/ml</b>
<b>2. pCDNA 3.1 map3773c</b>	<b>2.304</b>	<b>115.18 µg/ml</b>
<b>3 pCDNA 3.1</b>	<b>2.344</b>	<b>117.22 µg/ml</b>

## 8.2. Confirmación del inserto del *gen map3773c*, clonado en *pcDNA 3.1* a partir de la clona 8 de *E. coli BL21 (DE3)*.

En la siguiente figura se observa la verificación del inserto del *gen map3773c* con el tamaño esperado de aproximadamente 420pb. La interpretación es de izquierda a derecha en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 y 3 se observan las digestiones de *pcDNA3.1 map3773c* y por último en el carril 4 y 5 se observa *pcDNA3.1* sin digerir. En la figura presente se puede observar con más claridad las bandas esperadas, se utilizaron los siguientes controles por duplicado: como control positivo en los carriles 4 y 5 el plásmido con inserto para comparar la digestión en el podemos observar que si está tanto el plásmido con el inserto en el peso esperado de 6648 pb; el segundo control con digestión en los carriles 2 y 3; el plásmido con tratamiento enzimático para verificar su integridad y verificar la integridad del inserto puro, en el carril 1 se dispuso del marcador de peso molecular solo para comparar el tamaño con respecto al inserto digerido. Por tanto, se confirmó la presencia del *gen de MAP3773c* mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio, obteniendo los fragmentos esperados de aproximadamente 420pb, como se muestra en la figura 8.



**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación del inserto del *gen MAP3773c*, con el tamaño esperado de aproximadamente 420pb. Carriles de izquierda a derecha. Carril 1. Marcador de peso molecular, Carril 2 y 3 digestiones *pcDNA3.1-MAP3773c*, carril 4 y 5 *pcDNA 3.1* sin digerir.**

### 8.3. Expresión de MCP-1 en la línea celular J774A.1 en 24 y 48 horas.

Para evaluar la expresión de MCP-1 en la línea celular J774A.1, la cual fueron previamente transfectadas con el inserto pcDNA.3.1 map3773c, a todos los controles/tratamientos se le agrego neomicina en una concentración de 400 mg/mL menos al control de células no transfectadas, para evaluar que no generará un efecto inesperado con la técnica realizada, se llevaron en este procedimiento controles los cuales fueron células no transfectadas, células transfectadas sin inserto y en las células transfectadas con inserto se usó FeNTA 400 uM únicamente, estos experimentos se realizaron en intervalos de 24 y 48 horas respectivamente.

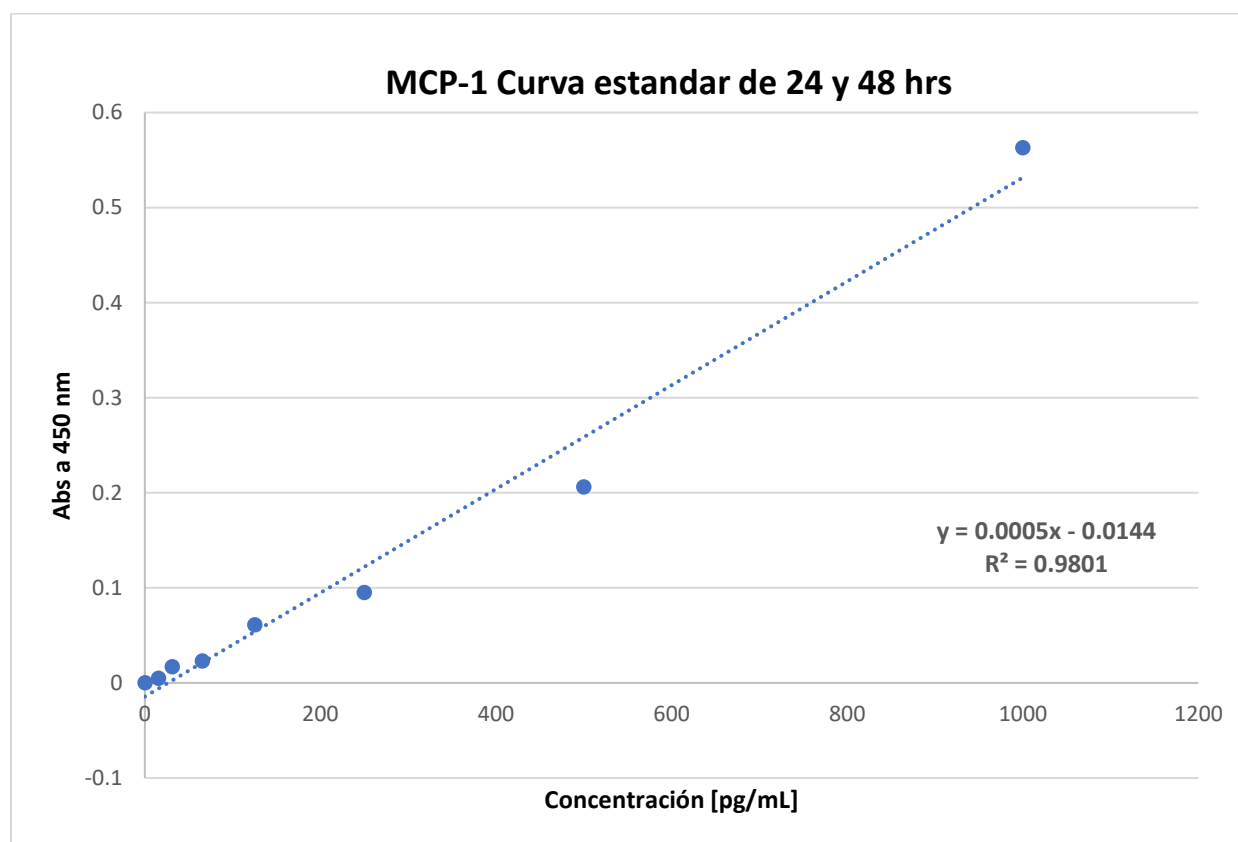
Se cuantificaron los niveles de MCP-1 mediante la técnica de ELISA en sobrenadantes de cultivo de macrófagos tratados por diferentes controles/tratamientos. Primero se realizó una curva estándar de 8 puntos para posteriormente determinar los valores de concentración de los diferentes tratamientos realizados. Las siguientes concentraciones y absorbancias de la curva estándar de Mouse MCP-1 platinum ELISA son demostrados en la tabla 3 y figura 9. Las placas se leyeron en un lector de absorbancia de microplacas (BIO-RAD, ¡Mark) en 450 nm. Una cantidad menor que el valor de corte inferior para cada citocina se consideró como cero. Cálculo de la curva estándar para cada citocina, valores de MCP-1 por ultimo el uso de la neomicina indican que la **neomicina** puede inducir una mayor producción de MCP-1, lo que sugiere que este antibiótico podría tener efectos secundarios en la modulación de la inflamación y además las células que hayan aceptado el plásmido con el inserto tendrán la resistencia adquirida a este antibiótico. [91].

	Control sin tratamiento	pcDNA-map3773c+neo	pcDNA3.1+neo	Control+neo	pcDNA-map3373c+neo+FeNTA	
Concentracion 1	296.109	222.449	977.014	0.055	111.061	
Concentracion 2	301.498	229.635	984.2	0.055	121.84	
Promedio	298.8035	226.042	980.607	0.055	116.4505	
Desviacion Estan	3.811	5.081	5.081	0.000	7.622	
Anova: Un factor						
Resumen						
Grupos	Replicas	Suma	Promedio	Varianza		
Control (Sin Tra	2	597.607	298.8035	14.5206605		
pcDNAmap3773c	2	452.084	226.042	25.819298		
pcDNA3.1+Neo	2	1961.214	980.607	25.819298		
Sin transfectar +	2	0.11	0.055	0		
pcDNAmap3773c	2	232.901	116.4505	58.0934205		
ANOVA						
origen de Variacio	SS	df	MS	F	P-valor	F crit
Entre grupos	1178759.554	4	294689.8885	11858.49253	3.99137E-10	5.192167773
con los grupos	124.252677	5	24.8505354			
Total	1178883.807	9				

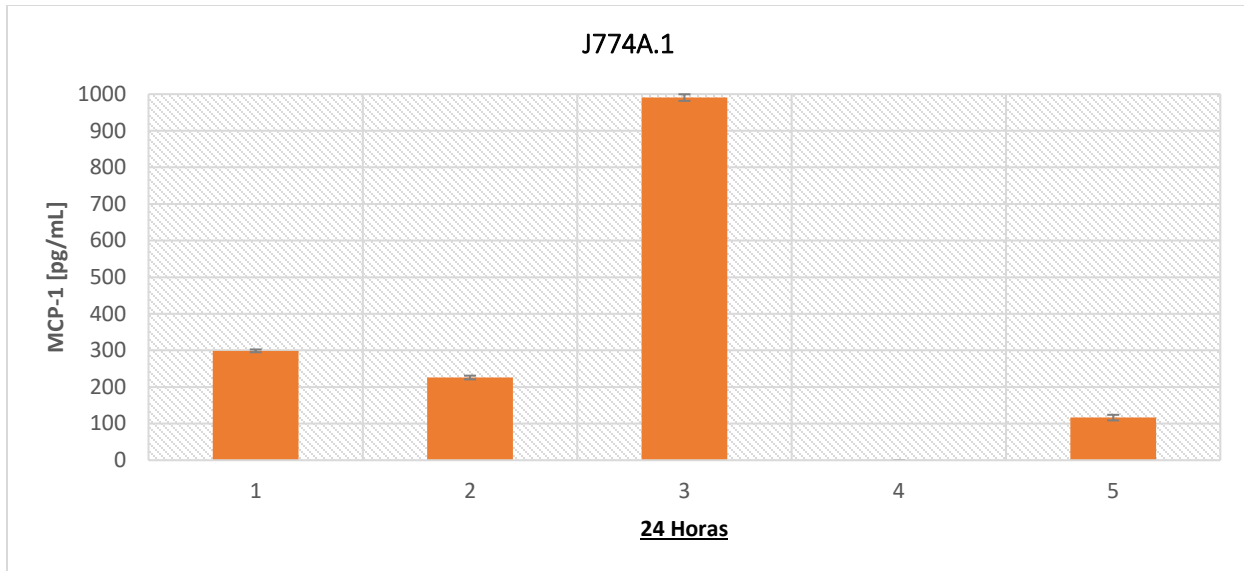
**Figura 9. Resultados de ANOVA**

**Tabla 3. Concentraciones y absorbancias de la curva estándar Mouse MCP-1 Platinum ELISA.**

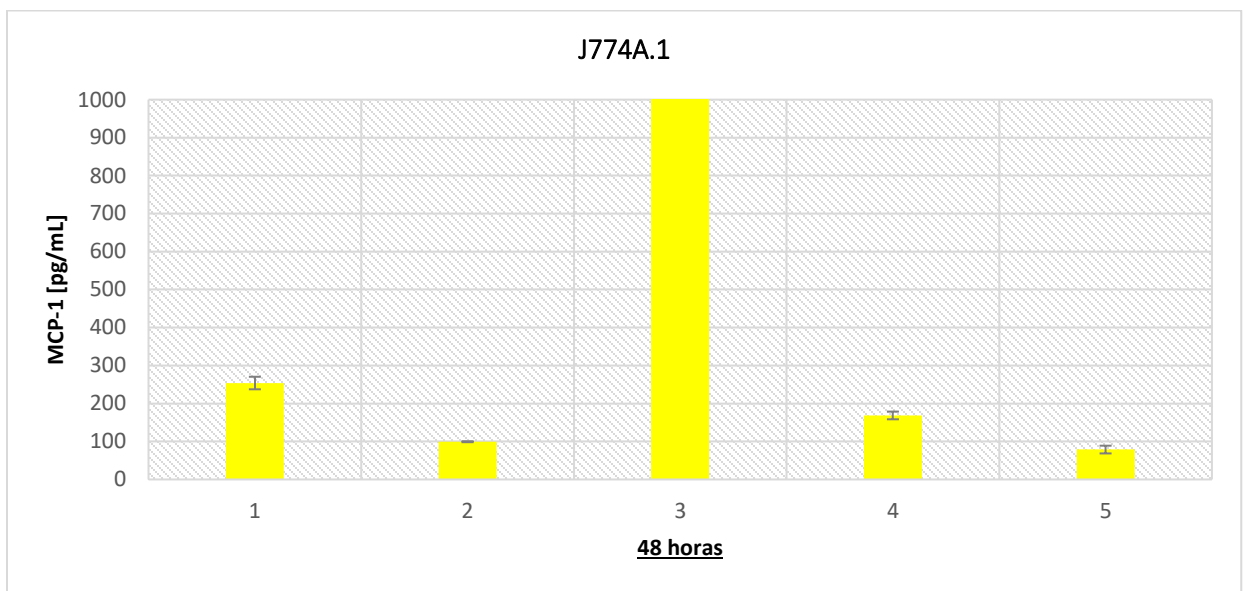
30 DE MAYO DEL 2023	
CURVA ESTANDAR DE MCP-1 [24 y 48 hrs]	
Concentración [pg/mL]	Absorbancia a 450 nm
0	0.000
15.6	0.074
31.3	0.086
62.5	0.092
125	0.130
250	0.164
500	0.275
1000	0.632



**Figura 10. Curva estandar de Mouse MCP-1 Platinum ELISA.**



**Figura 11.** Gráfica de barras de Mouse MCP-1 Platinum ELISA 24 hrs.  $p \leq 0,05$ . Resultados de izquierda a derecha controles/tratamientos 1. J774A.1 basal 2. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] 3. J774A.1 transfectadas sin pcDNA 3.1 + neomicina [400 mg/mL] 4. J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL] 5. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM].



**Figura 12.** Grafica de barras de Mouse MCP-1 Platinum ELISA 48 hrs. Datos tratados y obtenidos mediante Excel 2021.  $p \leq 0,05$ . Resultados de izquierda a derecha controles/tratamientos 1. J774A.1 basal 2. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] 3. J774A.1 transfectadas sin pcDNA 3.1 + neomicina [400 mg/mL] 4. J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL] 5. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM].

**Tabla 4. Resultados de Mouse MCP-1 Platinum ELISA. Condiciones de los tratamientos, tipo de tratamientos y concentraciones finales de los experimentos realizados durante 24 horas. Datos sobre la concentración de los sobrenadantes de MPC-1 a 24 horas (en pg/mL):**

Tratamientos (24 horas)	Condiciones de los tratamientos	Concentración MCP-1 (pg/mL) 24 hrs
1	J774A.1 blanco	298.803
2	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL]	226.042
3	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 + neomicina [400 mg/mL]	990.607
4	J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL]	0.055
5	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM]	116.45

**Tabla 5. Resultados de Mouse MCP-1 Platinum ELISA. Condiciones de los tratamientos, tipo de tratamientos y concentraciones de MCP-1 finales de los experimentos realizados durante 48 horas. Datos sobre la concentración de los sobrenadantes de MCP-1 a 48 horas (en pg/mL):**

Tratamiento (48 horas)	Condiciones de los tratamientos.	Concentración MCP-1 (pg/mL) 48 hrs
1	J774A.1 blanco	253.889
2	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL]	99.382
3	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 + neomicina [400 mg/mL]	1023.725
4	J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL]	168.551
5	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 MAP3773c + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM]	78.722

## IX. DISCUSIÓN

### Comparación de los tratamientos y resultados obtenidos

#### 1. J774A.1 no transfectadas:

24 horas: 298.803 pg/mL

48 horas: 253.889 pg/mL

Se observa una disminución en la concentración de MCP-1 a las 48 horas. Esto puede indicar que la respuesta inflamatoria en las células no transfectadas disminuye con el tiempo, lo cual es esperado, ya que la producción de MCP-1 generalmente se regula a la baja en ausencia de estímulos adicionales.

#### 2. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 *map3773c* + neomicina [400 mg/mL]:

24 horas: 226.042 pg/mL

48 horas: 99.382 pg/mL

La concentración de MCP-1 en estas células también disminuye de 24 a 48 horas. Esto puede reflejar que, aunque la transfección con *map3773c* reduce la producción de MCP-1 en comparación con las células no transfectadas, su efecto inhibitorio se vuelve más evidente con el tiempo, sugiriendo que *map3773c* podría estar modulando la respuesta inflamatoria de manera sostenida.

#### 3. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 sin *gen map3773c* + neomicina [400 mg/mL]:

24 horas: 990.607 pg/mL

48 horas: 1023.725 pg/mL

Aquí vemos un aumento de MCP-1 entre las 24 y 48 horas. Este aumento podría indicar que las células no transfectadas con el gen de interés, pero con neomicina tienen una respuesta inflamatoria más robusta, posiblemente por la activación de mecanismos celulares debido a la neomicina. La transfección de células con pcDNA 3.1 sin el gen *map3773c* parece inducir una mayor liberación de MCP-1, tal vez como respuesta a la transfección misma o a la activación de vías de estrés.

#### **4. J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL]**

24 horas: 0.055 pg/mL

48 horas: 168.551 pg/mL

Este aumento en la producción de MCP-1 a las 48 horas es significativo. Puede sugerir que la neomicina, a medida que se acumula o interactúa con las células, genera una mayor liberación de MCP-1 con el tiempo. Este efecto es notablemente bajo a las 24 horas, pero se incrementa significativamente después de 48 horas, lo que podría indicar un efecto temporal de la neomicina que se manifiesta más claramente después de un período de incubación más largo.

#### **5. J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 *map3773c* + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM]**

24 horas: 116.45 pg/mL

48 horas: 78.722 pg/mL

Similar al patrón observado en las células transfectadas con pcDNA 3.1 + *map3773c* + neomicina, la concentración de MCP-1 disminuye a las 48 horas. Esto podría indicar que la combinación de *map3773c* y FeNTA reduce la producción de MCP-1 con el tiempo. El tratamiento con FeNTA podría estar reforzando el efecto inhibitorio de *map3773c*, teniendo como posibles mecanismos por ejemplo la quelación de Hierro, en donde *map3773c* podría necesitar hierro como cofactor para su actividad reguladora, FeNTA podría estabilizar la interacción con el hierro. Segundo FeNTA induce cambios conformacionales en *map3773c* al unirse a residuos específicos que interactúan con metales, como cisteínas o histidinas. Esto podría afectar su capacidad para unirse al ADN u otras proteínas reguladoras, tercero FeNTA podría formar un complejo con la proteína para facilitar su transporte al núcleo, posiblemente aumentando la afinidad por receptores nucleares dependientes de metales, cuarto y último, si el FeNTA está involucrado en reacciones redox, podría generar especies reactivas de oxígeno en presencia de *map3773c*, lo que puede tener un efecto indirecto sobre la actividad reguladora al modificar el ambiente celular todo esto resultando en una disminución progresiva de MCP-1.

En general, **map3773c** parece tener un efecto modulador sobre la producción de MCP-1 en macrófagos J774A.1. En las células transfectadas con el *gen*, **map3773c** se observa una **reducción en los niveles de MCP-1** tanto a las 24 horas como a las 48 horas, lo que sugiere **map3773c** tiene un potencial efecto inhibitor sobre la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, las **células transfectadas** (solo con pcDNA 3.1) muestran un **aumento de MCP-1** con el tiempo, lo que podría estar relacionado con una respuesta inflamatoria. La neomicina parece jugar un papel importante, ya que en las células no transfectadas, pero con neomicina, hay un aumento progresivo de MCP-1 con el tiempo, lo que sugiere que la neomicina tiene un efecto que se vuelve más pronunciado a las 48 horas. La neomicina es un antibiotico aminoglucósido que puede generar estrés celular o activar vías inflamatorias, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. En algunos modelos celulares. El estrés celular puede activar vías de señalización como NF-κB o MAPK, que están implicadas en la expresión de citocinas como MCP-1. Sin embargo, estos efectos no son específicos ni deseados, y suelen ocurrir a concentraciones altas o bajo condiciones de exposición prolongada. Para nosotros poder determinar si la neomicina tiene un efecto directo o indirecto en la expresión de MCP-1, se puede realizar un ensayo de estrés oxidativo (como DCFH-DA) para evaluar si la neomicina está generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y por último analizar la expresión de vías inflamatorias como NF-κB mediante Western blot o RT-qPCR. [89]

Los tratamientos con **FeNTA** y **map3773c** parecen tener un efecto inhibitor adicional a las 48 horas, como se observa en la disminución de MCP-1, lo que refuerza la idea de que **MAP3773c** podría regular negativamente la respuesta inflamatoria.

En este estudio, investigamos el efecto de la sobreexpresión de la proteína **map3773c** en la línea celular J774A.1. Observamos una reducción significativa en la expresión de MCP-1 después de la transfección con el plásmido pcDNA 3.1 utilizando lipofectamina. Este resultado sugiere que **MAP3773c** podría actuar como un regulador negativo de la expresión de MCP-1 en estas células. [90]

Este hallazgo es consistente con la función conocida de MAP3773c como una proteína que se cree que desempeña un papel crucial en la patogenicidad de la bacteria. Además, la baja expresión de MCP-1 podría estar mediada por la interferencia con los mecanismos de transcripción o señalización necesarios para su expresión, así como por la activación de respuestas de estrés celular inducidas por la lipofectamina. La **lipofectamina**, como agente de transfección lipídico, puede causar **estrés celular** debido a varios mecanismos moleculares asociados a su interacción con las células y a los procesos involucrados en la internalización del material genético. A continuación, te detallo cómo podría generar estrés celular en el nivel molecular: [90]

### **Alteración de la Membrana Celular**

La lipofectamina interactúa con la membrana plasmática para facilitar la entrada del complejo ADN-lípido al interior de la célula, lo que puede: **Desestabilizar la bicapa lipídica**, generando cambios en la fluidez y estructura de la membrana. Activar receptores sensibles a daño en la membrana, como **canales de calcio dependientes de voltaje**. El aumento de calcio intracelular puede activar vías de señalización asociadas al estrés, como la activación de **proteína quinasa C (PKC)** y la **fosforilación de MAPK**. [88]

### **Respuesta al ADN Exógeno**

El ADN plasmídico introducido por la lipofectamina puede ser reconocido por sensores intracelulares como: **TLR9 (Toll-like receptor 9)** en endosomas, que detecta ADN rico en motivos CpG. **cGAS-STING (cGAMP sintetasa - Interferon Genes)**, un mecanismo citosólico que detecta ADN exógeno. Esto desencadena respuestas inflamatorias y antivirales, incluyendo la producción de **citoquinas proinflamatorias** como TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1. [90]

## **Estrés del Retículo Endoplásmico (ER)**

La entrada de material exógeno y la posible sobreexpresión de proteínas recombinantes pueden sobrecargar el retículo endoplásmico, activando la **respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)**: Activación de sensores como **IRE1**, **PERK** y **ATF6**, que intentan restaurar la homeostasis del ER. Si el estrés persiste, esto puede inducir apoptosis a través de la liberación de **CHOP** y la activación de **caspasas**. [94]

## **Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)**

El proceso de internalización y las respuestas inflamatorias pueden aumentar la producción de ROS: La alteración de mitocondrias debido a cambios en el calcio intracelular puede causar disfunción mitocondrial y producción de ROS. Los ROS activan vías de señalización de estrés como **NF-κB**, **p38 MAPK** y **JNK**, que pueden amplificar respuestas inflamatorias [90,91]

## **Vías de Inflamación Celular**

El estrés inducido por la lipofectamina puede activar vías inflamatorias clave: **NF-κB**: Translocación al núcleo, promoviendo la expresión de citoquinas proinflamatorias como MCP-1, TNF-α e IL-1β. **p38 MAPK y JNK**: Promueven la apoptosis o respuestas inflamatorias según la intensidad del estrés [91,92]

## **Inducción de Autofagia**

La presencia de ADN exógeno y daño en organelos puede inducir la autofagia como un intento de las células de degradar y procesar los complejos lipofectamina-ADN: Si esta respuesta es insuficiente o desregulada, puede contribuir al estrés celular [95,96]

Los resultados sugieren que MAP3773c podría tener un **efecto inhibitorio sobre la producción de MCP-1**, un importante mediador inflamatorio en los macrófagos. Esto sugiere que MAP3773c podría jugar un papel en la **modulación negativa de la respuesta inflamatoria**, lo que podría ser relevante en enfermedades donde la inflamación crónica juega un papel central, como en enfermedades autoinmunes o inflamatorias [87]

Dado el comportamiento observado en los niveles de MCP-1, una perspectiva futura sería investigar las **vías moleculares** exactas a través de las cuales MAP3773c ejerce su efecto sobre la inflamación. Esto podría incluir el estudio de **vías de señalización como NF- $\kappa$ B**, MAPK, o JAK/STAT, que son conocidas por regular la expresión de citocinas proinflamatorias [93]

**Interacción con otros mediadores inflamatorios:** Además de MCP-1, sería útil investigar cómo MAP3773c podría influir en la producción de otras citocinas y quimiocinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 o IL-1 $\beta$ , para obtener una visión más amplia de su impacto en la respuesta inflamatoria [87, 93]

**Impacto de la neomicina y FeNTA en la respuesta inflamatoria:**

**Efecto de la neomicina:** Los resultados indican que la **neomicina** puede inducir una mayor producción de MCP-1, lo que sugiere que este antibiótico podría tener efectos secundarios en la modulación de la inflamación. [91]

**FeNTA y su papel en la inflamación:** El hecho de que el tratamiento con FeNTA (posiblemente un agente inflamatorio o modulador [88,89,97]) refuerce la disminución de MCP-1 en presencia de MAP3773c sugiere que FeNTA podría interactuar con MAP3773c para amplificar su efecto antiinflamatorio. Esto abre la posibilidad de usar FeNTA como un adyuvante en experimentos futuros o incluso como un tratamiento en combinación con MAP3773c para lograr un control más efectivo de la inflamación. [91].

## **X. CONCLUSIÓN**

La proteína MAP3773c parece reducir la producción de MCP-1 en macrófagos J774A.1 a lo largo del tiempo (24 a 48 horas), lo que podría ser un indicador de su papel en la modulación de la inflamación.

La neomicina tiene un efecto gradual sobre la producción de MCP-1, sugiriendo que, en ausencia del gen MAP3773c, la respuesta inflamatoria se mantiene o aumenta.

El tratamiento con FeNTA refuerza la disminución de MCP-1 cuando se transfectan las células con MAP3773c, lo que indica un efecto antiinflamatorio o supresor adicional en presencia de MAP3773c.

Estos resultados son importantes para entender cómo MAP3773c modula la inflamación en macrófagos y cómo estos efectos cambian con el tiempo, lo cual podría tener aplicaciones terapéuticas en enfermedades inflamatorias.

Es importante destacar que la transfección con lipofectamina puede inducir estrés celular y activar respuestas de estrés que podrían influir en la expresión de MCP-1. Además, se necesitan más estudios para entender completamente los mecanismos moleculares subyacentes y para validar estos hallazgos en modelos in vitro.

En conclusión, nuestros resultados indican que MAP3773c regula negativamente tanto la expresión de MCP-1 en la línea celular J774A.1 Estos hallazgos sugieren un papel crucial de MAP3773c en la modulación de la respuesta inflamatoria, lo que podría tener implicaciones significativas para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra la paratuberculosis y otras enfermedades infecciosas.

## XI. BIBLIOGRAFIA

1. Ssekitoleko, J.; Ojok, L.; Abd El Wahed, A.; Erume, J.; Amanzada, A.; Eltayeb, E.; Eltom, K.H.; Okuni, J.B. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Virulence: A Review. *Microorganisms* 2021, 9, 2623. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122623>.
2. Cousins, D.; Condrón, R.; Eamens, G.; Whittington, R.; De Lisle, G. Paratuberculosis (Johne's disease). *Aust. N. Z. Stand. Diagn. Proced.* **2002**, 1, 1–21.
3. Olsen, I.; Sigurgardottir, G.; Djonne, B. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet. Q.* **2002**, 24, 12–28.
4. Hermon-Taylor, J.; Bull, T.J.; Sheridan, J.M.; Cheng, J.; Stellakis, M.L.; Sumar, N. Causation of Crohn's Disease by *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis*. *Can. J. Gastroenterol.* **2000**, 14, 798305.
5. Correa-Valencia, N.; García-Tamayo, Y.M.; Fernández-Silva, J.A. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Colombia (1924-2016): A review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **2018**, 31, 165–179.
6. Webb, S.A.; Kahler, C.M. Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences. *Crit. Care* **2008**, 12, 234.
7. Verna, A.E.; Garcia-Pariente, C.; Muñoz, M.; Moreno, O.; García-Marin, J.F.; Romano, M.I.; Paolicchi, F.; Perez, V. Variation in the Immuno-pathological Responses of Lambs after Experimental Infection with Different Strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Zoonoses Public Health* **2007**, 54, 243–252.
8. Saviola, B.; Bishai, W. El género Mycobacterium—Medical. En *Los procariotas*; Springer: Berlín/Heidelberg, Alemania, 2006; págs. 919-933.
9. Stevenson, K. Diversidad genética de la subespecie paratuberculosis de Mycobacterium avium y la influencia del tipo de cepa en la infección y la patogénesis: una revisión. *Res. Vet.* **2015**, 46, 64.
10. Conde, C.; Price-Carter, M.; Cochard, T.; Branger, M.; Stevenson, K.; Whittington, R.; Bannantine, J.P.; Biet, F. El análisis del genoma completo de las inserciones de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis IS900 revela modalidades específicas del tipo de cepa. *Frente. Microbiol.* **2021**, 12, 660002.
11. Hodgeman, R.; Mann, R.; Savin, K.; Djitro, N.; Rochfort, S.; Rodoni, B. Caracterización molecular de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en Australia. *BMC Microbiol.* **2021**, 21, 101.
12. Dimareli-Malli, Z.; Stevenson, K.; Sarris, K.; Sossidou, K. Estudio de los aspectos microbiológicos y de tipificación molecular de la paratuberculosis en ovejas y cabras en el norte de Grecia. *Transenlazado. Emerger. Dis.* **2009**, 56, 285–290.

13. Sevilla, I.; Li, L.; Amonsin, A.; Garrido, J.M.; Geijo, M.V.; Kapur, V.; Juste, R.A. Análisis comparativo de aislados de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis de bovinos, ovinos y caprinos mediante repetición de secuencia corta y tipificación por electroforesis en gel de campo pulsado. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 204.
14. Bryant, J.M.; Thibault, V.C.; Smith, D.G.; McLuckie, J.; Garza, I.; Sevilla, I.A.; Biet, F.; Harris, S.R.; Maskell, D.J.; Bentley, Dakota del Sur; y cols. Exploración filogenómica de las relaciones entre cepas de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis. *BMC Genómica* **2016**, *17*, 79.
15. Leao, C.; Goldstone, R.J.; Bryant, J.; McLuckie, J.; Inácio, J.; Smith, D.G.; Stevenson, K. Nuevo ensayo basado en polimorfismo de nucleótido único para el genotipado de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 556–564.
16. Whittington, R.J.; Marisma, I.B.; Whitlock, R.H. La tipificación de los polimorfismos de IS 1311 confirma que los bisontes (*Bison bison*) con paratuberculosis en Montana están infectados con una cepa de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis distinta de la que se encuentra en el ganado y otros animales domésticos. *Mol. Sondas celulares* **2001**, *15*, 139–145.
17. Sevilla, I.; Singh, S.; Garrido, J.; Aduriz, G.; Rodríguez, S.; Geijo, M.; Whittington, R.; Saunders, V.; Whitlock, R.; Juste, R. Tipificación molecular de cepas de paratuberculosis de la subespecie *Mycobacterium avium* de diferentes huéspedes y regiones. *Revue Scientifique et Technique-Office International Des Epizooties* **2005**, *24*, 1061.
18. Lim, J.; Parque, H.T.; Ko, S.; Parque, S.E.; Lee, G.; Kim, S.; Shin, M.K.; Yoo, H.S.; Kim, D. Diversidad genómica de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: enfoque pangénomico para resaltar características genómicas únicas con genomas completos recién construidos. *Res. Vet.* **2021**, *52*, 46.
19. Idris, S.M.; Eltom, K.H.; Okuni, J.B.; Ojok, L.; Elmagzoub, W.A.; El Wahed, A.A.; Eltayeb, E.; Gameel, A.A. Paratuberculosis: The Hidden Killer of Small Ruminants. *Animals* **2022**, *12*, 12. <https://doi.org/10.3390/ani12010012>
20. West D.M., Bruère A.N., Ridler A.L. *Las ovejas: salud, enfermedad y producción*. 3ª ed. Educación Continua Veterinaria, Universidad de Massey; Palmerston North, Nueva Zelanda: 2009.
21. Cunha V.M., Rosalino L.M., Leao C., Bandeira V., Fonseca C., Botelho A., Reis A.C. Impulsores ecológicos de *Mycobacterium avium* subsp. Detección de paratuberculosis en mangosta (*Herpestes ichneumon*) utilizando Is900 como proxy. *Rep. Científica* **2020**; *10*:860. doi: 10.1038/s41598-020-57679-3.
22. Curlik J., Lazar P., Iglodyova A., Barbusinova E., Smiga L., Novotny J., Mojzisova J., Ondrejкова A., Hromada R., Konjevic D., et al. Detección de *Mycobacterium*

- avium* Subsp. Paratuberculosis en la vida silvestre eslovaca. *Pol. J. Vet. Sci.* 2020; 23:529-535.
23. Stanitznig A., Khol J.L., Lambacher B., Franz S., Wittek T., Kralik P., Slana I., Vasickova P. Prevalencia de la subespecie de *Mycobacterium avium* paratuberculosis y hepatitis E en camélidos del Nuevo Mundo en Austria. *Vet. Rec.* 2017; Isaías 181:46. doi: 10.1136/vr.104246.
  24. Garvey M. *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis: un posible agente causal en la morbilidad humana y el riesgo para la seguridad de la salud pública. *Abierto Vet. J.* 2018; 8:172-181. doi: 10.4314/ovj.v8i2.10.
  25. Bharathy S., Gunaseelan L., Porteen K. Explorando el peligro potencial de la subespecie paratuberculosis de *Mycobacterium avium* como causa de la enfermedad de Crohn. *Mundo Veterinario.* 2017; 10:457-460. doi: 10.14202/vetworld.2017.457-460.
  26. Garvey M. *Mycobacterium avium* Paratuberculosis: una carga de enfermedad en la industria láctea. *Animales.* 2020; 10:1773. doi: 10.3390/ani10101773.
  27. Singh S., Dhakal I.P., Singh U.M., Devkota B.N. Técnicas diagnósticas actuales de *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis en rumiantes domésticos. *J. Agric. For. Univ.* 2018; Efesios 2:23–34.
  28. Okuni J.B. Ocurrencia de paratuberculosis en países africanos: una revisión. *J. Vet. Adv.* 2013; Isaías 3:1–8.
  29. Okuni J.B., Hansen S., Eltom K.H., Eltayeb E., Amanzada A., Omega J.A., Czerny C.P., el Wahed A.A., Ojok L. Paratuberculosis: una posible zoonosis y una enfermedad desatendida en África. *Microorganismos.* 2020; 8:1007. DOI: 10.3390/Microorganismos8071007.
  30. Omega J.A., Musalia L.M., Kuria J.K. Conocimiento, actitud y prácticas hacia la paratuberculosis en ganado vacuno y ovino en el condado de Kericho y el subcondado de Konoin, Kenia. *Afr. J. Educ. Sci. Technol.* 2019; Isaías 5:76–86.
  31. OIE. *Código Sanitario para los Animales Terrestres.* 28ª ed. Organización Mundial de Sanidad Animal; París, Francia: 2019. Volumen 1, Enfermedades, infecciones e infestaciones enumeradas por la OIE.
  32. Matthews C., Cotter P.D., O'Mahony J. Map, La enfermedad de Johne y el microbioma; Conocimiento actual y consideraciones futuras. *Anim. Microbioma.* 2021; Isaías 3:34. doi: 10.1186/s42523-021-00089-1.
  33. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R. Los cambios en la microbiota intestinal controlan la inflamación inducida por la endotoxemia metabólica en la obesidad y la diabetes inducidas por la dieta alta en grasas en ratones. *Diabetes.* 2008; 57:1470-1481. doi: 10.2337/db07-1403.
  34. Rieger A., Meylan M., Hauser C., Knubben-Schweizer G. Metaanálisis para estimar las pérdidas económicas causadas por la reducción de la producción de

- leche y el rendimiento reproductivo asociados con la paratuberculosis bovina en Suiza. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2021; 164:737-751. doi: 10.17236/sat00324.
35. Rasmussen P., Barkema H.W., Mason S., Beaulieu E., Hall D.C. Pérdidas económicas debidas a la enfermedad de Johne (paratuberculosis) en el ganado lechero. *J. Dairy Sci.* 2021; 104:3123–3143. DOI: 10.3168/jds.2020-19381.
  36. Mendes S., Boinas F., Albuquerque T., Fernandes L., Afonso A., Amado A. Estudios epidemiológicos sobre la paratuberculosis en pequeños rumiantes en Portugal. *Epidémiol. Santé Anim.* 2004; 45:61-71.
  37. Devendra C. Pequeños rumiantes: valor potencial y contribución al desarrollo sostenible. *Perspectivas Agric.* 1994; Isaías 23:97-103. DOI: 10.1177/003072709402300205.
  38. Whittington R., Donat K., Weber M.F., Kelton D., Nielsen S.S., Eisenberg S., Arrigoni N., Juste R., Saez J.L., Dhand N., et al. Control de la paratuberculosis: quién, por qué y cómo. Una revisión de 48 países. *BMC Vet. Res.* 2019; 15:198. DOI: 10.1186/s12917-019-1943-4.
  39. Bush R.D., Windsor P.A., Toribio J.A. Pérdidas de ovejas adultas debido a la enfermedad de Johne ovina en 12 parvadas infectadas durante un período de 3 años. *Aust. Vet. J.* 2006; 84:246-253. doi: 10.1111/j.1751-0813.2006.00001x.
  40. Windsor, P.A. Gestión de programas de control de la linfadenitis caseosa ovina y la paratuberculosis en Australia, y la necesidad de una vacunación persistente. *Vet. Med.* 2014; Isaías 5:11–22. doi: 10.2147/VMRR.S44814.
  41. Ashworth S., Gunn G.J. Pérdidas asociadas con la paratuberculosis en ovejas. En: Galdow G., Gunn G.J., editores. *Evaluación de la vigilancia y el control de la enfermedad de Johne en animales de granja en Gb.* División Veterinaria SAC; Edimburgo, Reino Unido: 2001. págs. 103-115.
  42. Sardaro R., Pieragostini E., Rubino G., Petazzi F. Impacto de la subespecie paratuberculosis de *Mycobacterium avium* en la eficiencia de los beneficios en granjas semiextensivas de ovejas y cabras lecheras de Apulia, sur de Italia. *Prev. Vet. Med.* 2017; Isaías 136:56-64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.11.013.
  43. Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P.G. et al. Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers* 6, 22 (2020).
  44. Rosenfeld G, Bressler B. Mycobacterium avium paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Can J Gastroenterol.* 2010 Oct;24(10):619-24. doi: 10.1155/2010/698362. PMID: 21037992; PMCID: PMC2975476.
  45. Ng, S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 390, 2769–2778 (2018).
  46. Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F. & Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *Lancet* 389, 1741–1755 (2017).

47. Thia, K. T., Sandborn, W. J., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R. & Loftus, E. V. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort.
48. Sallam, A.M.; Zare, Y.; Alpay, F.; Shook, G.E.; Collins, M.T.; Alsheikh, S.; Sharaby, M.; Kirkpatrick, B.W. An across-Breed Genome Wide Association Analysis of Susceptibility to Paratuberculosis in Dairy Cattle. *J. Dairy Res.* 2017, 84, 61–67.
49. Romdhane, B.R.; Beaunee, G.; Camanes, G.; Guatteo, R.; Fourichon, C.; Ezanno, P. Which Phenotypic Traits of Resistance Should Be Improved in Cattle to Control Paratuberculosis Dynamics in a Dairy Herd: A Modelling Approach. *Vet. Res.* 2017, 48, 62.
50. Morris, C.A.; Hickey, S.M.; Henderson, H.V. The Effect of Johne's Disease on Production Traits in Romney, Merino and Merino X Romney-Cross Ewes. *N. Z. Vet. J.* 2006, 54, 204–209.
51. Singh, P.K.; Singh, S.V.; Singh, M.K.; Saxena, V.K.; Horin, P.; Singh, A.V.; Sohal, J.S. Effect of Genetic Variation in the Mhc Class II Drb Region on Resistance and Susceptibility to Johne's Disease in Endangered Indian Jamunapari Goats. *Int. J. Immunogenet.* 2012, 39, 314–320.
52. Begg, D.J.; Purdie, A.C.; de Silva, K.; Dhand, N.K.; Plain, K.M.; Whittington, R.J. Variation in Susceptibility of Different Breeds of Sheep to Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis Following Experimental Inoculation. *Vet. Res.* 2017, 48, 36.
53. Stewart, D.J.; Vaughan, J.A.; Stiles, P.L.; Noske, P.J.; Tizard, M.L.; Prowse, S.J.; Michalski, W.P.; Butler, K.L.; Jones, S.L. A Long-Term Bacteriological and Immunological Study in Holstein-Friesian Cattle Experimentally Infected with Mycobacterium avium Subsp. Paratuberculosis and Necropsy Culture Results for Holstein-Friesian Cattle, Merino Sheep and Angora Goats. *Vet. Microbiol.* 2007, 122, 83–96.
54. Stabel, J.R.; Bannantine, J.P.; Hostetter, J.M. Comparison of Sheep, Goats, and Calves as Infection Models for Mycobacterium avium Subsp. Paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2020, 225, 110060.
55. Park, H.T.; Park, H.E.; Cho, Y.I.; Kim, E.H.; Jung, M.; Shin, S.W.; Lee, S.H.; Kim, D.Y.; Yoo, H.S. Potential Biomarkers as an Indicator of Vertical Transmission of Johne's Disease in a Korean Native Cattle Farm. *J. Vet. Sci.* 2017, 18, 343–349.
56. Barrett, D.J.; Mee, J.F.; Mullaney, P.; Good, M.; McGrath, G.; Clegg, T.; More, S.J. Risk Factors Associated with Johne's Disease Test Status in Dairy Herds in Ireland. *Vet. Rec.* 2011, 168, 410
57. Clarke, C.J. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J. Comp. Pathol.* 1997, 116, 217–261

58. Whittington, R.J.; Sergeant, E.S. Progress Towards Understanding the Spread, Detection and Control of *Mycobacterium avium* Subsp Paratuberculosis in Animal Populations. *Aust. Vet. J.* 2001, 79, 267–278.
59. Carrigan, M.J.; Seaman, J.T. The Pathology of Johne's Disease in Sheep. *Aust. Vet. J.* 1990, 67, 47–50.
60. Jones, D.G.; Kay, J.M. Serum Biochemistry and the Diagnosis of Johne's Disease (Paratuberculosis) in Sheep. *Vet. Rec.* 1996, 139, 498–499
61. Bauman, C.A.; Jones-Bitton, A.; Menzies, P.; Toft, N.; Jansen, J.; Kelton, D. Prevalence Ofparatuberculosis in the Dairy Goat and Dairy Sheep Industries in Ontario. *Can. Vet. J.* 2016, 57, 169–175
62. Kruze, J.; Salgado, M.; Paredes, E.; Mella, A.; Collins, M.T. Goat Paratuberculosis in Chile: First Isolation and Confirmation of *Mycobacterium avium* Subspecies Paratuberculosis Infection in a Dairy Goat. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2006, 18, 476–479.
63. Djønne, B. Paratuberculosis in Goats. In *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*; Behr, M.A., Collins, D.M., Eds.; CAB International: Oxfordshire, UK, 2010; pp. 169–178.
64. Pérez V., García-Marín, J. F., & Badiola, J. J. (1996). From mouth to macrophage: Mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology*, 33(3), 335-356.
65. Abbas M, Munir M, Khalig SA, Hag MI, Tanveer Khan M, Qureshi ZU: Detection of paratuberculosis in breeding bulls at Pakistani semen production units: a continuous source of threat. *IRSN Vet Sci* 2011, 10:e501235.
66. Sorge SS, Kurnick S, Streevatsan S: Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the saliva of dairy cows: a pilot study. *Vet Microbiol* 2013, 164:383–386.
67. Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Peral DL, Weston RT, Bartos M, Pavlik I: Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Vet Microbiol* 2004, 102:247–255.
68. Sweeney RW: Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996, 12:305–312.
69. Sweeney RW: Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011, 27:537–546.
70. Rankin JD: The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. IV. Adult cattle maintained in an infectious environment. *J Comp Pathol* 1962, 72:113–117.
71. Sauter SN, Roffler B, Philipona C, Morel C, Romé V, Guilloteau P, Blum JW, Hammon HM: Intestinal development in neonatal calves: effects of glucocorticoids and dependence of colostrum feeding. *Biol Neonate* 2004, 85:94–104.

72. Patel D, Danelishvili L, Yamazaki Y, Alonso M, Paustian ML, Bannantine JP, Meunier-Goddik L, Bermudez LE: The ability of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. *Infect Immun* 2006, 74:2849–2855.
73. Fries PN, Popowych YI, Guan LL, Griebel PJ: Age-related changes in the distribution and frequency of myeloid and T cell populations in the small intestine of calves. *Cell Immunol* 2011, 271:428–437.
74. Malmuthuge N, Li M, Fries P, Griebel PJ, Guan LL: Regional and age dependent changes in gene expression of Toll-like receptors and key antimicrobial defense molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. *Vet Immunol Immunopathol* 2012, 146:18–26.
75. Pais TF, Appelberg R: Macrophage control of mycobacterial growth induced by picolinic acid is dependent on host cell apoptosis. *J Immunol* 2000, 164:389–397.
76. Minozzi G, Williams JL, Stella A, Strozzi F, Luini M, Settles ML, Taylor JF, Whitlock RH, Zanella R, Neibergs HL: Meta-analysis of two genome-wide association studies of bovine paratuberculosis. *PLoS One* 2012, 7:e32578.
77. Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Molina E, Koets AP, Rutten VP, Juste RA, Estonba A: Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet* 2010, 41:652–655.
78. Purdie AC, Plain KM, Begg DJ, de Silva K, Whittington RJ: Candidate gene and genome-wide association studies of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle and sheep: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011, 34:197–208.
79. Hermon-Taylor J: *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, Crohn's disease and the Doomsday scenario. *Gut Pathog* 2009, 1:15.
80. Rosseels V, Huygen K: Vaccination against paratuberculosis. *Expert Rev Vaccines* 2008, 7:817–832.
81. Uzonna JE, Chilton P, Whitlock RH, Habecker PL, Scott P, Sweeney RW: Efficacy of commercial and field-strain *Mycobacterium paratuberculosis* vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model. *Vaccine* 2003, 21:3101–3109.
82. Bannantine JP, Barletta RG, Stabel JR, Paustian ML, Kapur V: Application of the genome sequence to address concerns that *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis might be a foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis* 2004, 1:3–15.
83. Payne JM, Rankin JD: The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res Vet Sci* 1961, 2:167–174.

84. Sweeney RW, Uzonna J, Whitlock RH, Habecker PL, Chilton P, Scott P: Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res Vet Sci* 2006, 80:253–259.
85. Chandrashekar C, Gonzalez-Cano P, Fries P, Gomis S, Doig K, Scruten E, Potter A, Napper S, Griebel PJ: Host responses to persistent *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in surgically isolated bovine ileal segments. *Clin Vaccine Immunol* 2013, 20:156–165.
86. Määttänen P, Trost B, Scruten E, Potter A, Kusalik A, Griebel P, Napper S: Divergent immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection correlate with kinomic responses at the site of infection. *Infect Immun* 2013, 81:2861–2872.
87. Sanjiv Singh, D. Anshita, V. Ravichandiran, MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease, *International Immunopharmacology*, Volume 101, Part B, 2021, 107598, ISSN 1567-5769.
88. Dueñas Mena, D. L., Gutiérrez-Pabello, J. A., Quintero Chávez, K., Brito-Perea, M. D. C., Díaz Padilla, D. M., Cortez Hernández, O., Chávez Mendez, J. R., Alcalá Zacarias, J. M., Vela Sancho, G. B., & Landeros Sánchez, B. (2024). Binding of MAP3773c Protein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Mouse Ferroportin1 Coding Region. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12687.
89. Hernández-Guevara, E., Gutiérrez-Pabello, J. A., Quintero-Chávez, K., Brito-Perea, M. D. C., Hurtado-Ayala, L. A., Ibarra-Molina, G., Cortez-Hernández, O., Dueñas-Mena, D. L., Fernández-Otal, Á., Fillat, M. F., & Landeros-Sánchez, B. (2022). In Silico and In Vitro Analysis of MAP3773c Protein from *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Biology*, 11(8), 1183.
90. Thapa, S., Rathnaiah, G., Zinniel, D.K. *et al.* The Fur-like regulatory protein MAP3773c modulates key metabolic pathways in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* under in-vitro iron starvation. *Sci Rep* 14, 8941 (2024).
91. Gantner, B. N., & Chan, F. K.-M. (2018). Mechanisms of cellular stress induced by transfection reagents. *Cellular Signaling*, 43, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.10.005>
92. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
93. Schröder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- $\gamma$ : An overview of signals, mechanisms, and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>

94. Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
95. Nishitoh, H. (2012). Stress and death signals in ER stress-induced apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(48), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00048>
96. Zhao, Y., & Shao, F. (2022). Recognition of cytosolic DNA by cGAS-STING and other innate immune sensors in inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 22(12), 741–758. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00754-3>
97. Schroeder, A., Levins, C. G., Cortez, C., Langer, R., & Anderson, D. G. (2010). Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *Journal of Internal Medicine*, 267(1), 9–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02189.x>