

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA

Maestría en Ciencias de la Salud

TESIS

"Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c en el regulón de zinc de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*".

QFB CARMEN YUNUEN NIETO MORIN

DIRECTORA DE TESIS
DRA. BERTHA LANDEROS SANCHEZ

CO-DIRECTORA
DRA. LILIA ANGELICA HURTADO AYALA

Tijuana, B. C. Enero 2019

Índice

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCION.....	5
1.1. <i>Mycobacterium avium</i>	5
1.1.1. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	7
1.1.1.1. Enfermedad de John.....	9
1.1.1.1.1. Distribución geográfica.....	12
1.1.1.1.2. Patogenia.....	12
1.1.1.1.2.1. Fase tuberculoide o paucibacilar.....	13
1.1.1.1.2.2. Fase lepromatosa o multibacilar.....	14
1.1.1.1.3. Diagnostico.....	14
1.1.1.1.4. Enfermedad de Crohn.....	15
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Control de la concentración de metales intracelulares.....	18
2.1.1. Zinc.....	18
2.1.1.1. Mecanismo de captación de zinc.....	19
2.1.1.1.1. Mecanismo de captación de zinc de alta afinidad.....	19
2.1.1.1.1.1. Transportadores del tipo ABC.....	19
2.1.1.1.2. Mecanismo de captación de zinc de baja afinidad.....	19
2.1.1.1.3. Regulación de la captación de zinc.....	20
2.1.1.1.3.1. La proteína Zur.....	20
2.1.1.1.4. Otros reguladores de la concentración intracelular de zinc.....	21
2.1.1.1.4.1. ZntR.....	21
2.1.1.1.4.2. SmtB.....	21
2.1.1.1.4.3. ZiaR.....	22
2.1.1.2. Mecanismo de exportación de zinc.....	22
2.1.1.2.1. La ATPasa ZntA.....	22
2.1.1.2.2. Transportadores CDF.....	23
2.1.1.3. Isla de patogenicidad sensible al zinc en MAP.....	24
2.1.1.3.1. Regulón de zinc.....	24
2.1.1.3.2. Proteína MAP3773c.....	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4. JUSTIFICACION.....	27
5. HIPOTESIS.....	28
5.1. Hipótesis nula.....	28
5.2. Hipótesis alternativa.....	28
6. IMPACTOS.....	29
6.1. Científico.....	29
6.2. Tecnológico.....	29
6.3. Zoonotico.....	29
6.4. Económico-social.....	30
7. OBJETIVO GENERAL.....	31
7.1. Objetivos específicos.....	31
8. MATERIALES Y METODOS.....	32
8.1. Transformación de una cepa de <i>Escherichia coli</i> con el plásmido pRSET-MAP3773c y sobreexpresión de la proteína MAP3773c.....	32
8.2. Purificación de la proteína MAP3773c en columna de afinidad a metal inmovilizado con zinc.....	33
8.2.1. Preparación de la columna cromatográfica de zinc.....	33
8.2.2. Purificación y lisis celular.....	34
8.2.3. Análisis por electroforesis SDS-PAGE.....	35
8.2.4. Cuantificación de la proteína MAP3773c.....	36
8.3. Obtención de las sondas de ADN de las secuencias de la región promotora del regulón de zinc en MAP3773c.....	37

8.3.1. Alineamientos y diseño de secuencias de nucleótidos.....	37
8.4. Ensayo de cambio en la corrida electroforética.....	38
9. RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
9.1. Electroforesis SDS-PAGE para la purificación de la proteína MAP3773c.....	40
9.2. Alineamientos.....	41
9.3. Ensayo de cambio en la corrida electroforética.....	43
9.3.1. Secreción de tipo VII AAA-ATPasa EccA y proteína de la familia PPE.....	47
9.3.2. Regulación de la absorción Fe^{2+} y Zn^{2+}	49
9.3.3. Síntesis de cobalamina.....	50
9.3.4. Policétido sintasa y péptido sintasa no ribosomal.....	50
9.3.5. Transportador ABC, proteína de transporte del sistema ABC y transportador ATP-proteína de unión.....	51
9.3.5.1. MAP3734c-3736c.....	52
10. CONCLUSIONES.....	56
11. AGRADECIMIENTOS.....	57
12. REFERENCIAS.....	58

RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente causal de la enfermedad de John (paratuberculosis) en los rumiantes que se caracteriza como una enfermedad crónica progresiva cuyos signos y manifestaciones clínicas se presentan en la fase final de la infección. En los últimos años, diversos estudios y metaanálisis han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre MAP y la enfermedad de Crohn ya que en ambas hay muchas similitudes. La hipótesis de MAP como agente causal surgió a partir de la identificación de este patógeno en pacientes con la enfermedad de Crohn. Sin embargo, desde entonces múltiples estudios han sido realizados para comprobar esta asociación, con resultados variables. MAP posee una región específica del linaje denominado LSP14 y LSP15, implicada en su patogenicidad y en la homeostasis del metal. El metabolismo del zinc podría ser dependiente de la patogenicidad, por lo que en este proyecto de tesis se llevó a cabo una investigación de la interacción entre la proteína MAP3773c que tiene características similares a las proteínas Fur con genes que se encuentran exclusivamente en la isla de patogenicidad sensible al zinc en MAP y que contienen una caja de Zur, incluyendo el gen MAP3773c. Se realizaron ensayos de cambio en la corrida electroforética (EMSA) para cada una de las sondas de cada gen, dando como resultado una interacción de la proteína con 16 de éstas sondas. Algunas de las funciones de los genes son síntesis de cobalamina, síntesis de poliketido sintasa y proteínas de la familia PE/PPE, transportadores ABC y homeostasis de metales implicados en la virulencia y patogenicidad de MAP. De la misma manera, es posible que autorregule su propia transcripción al interactuar con el gen MAP3773c.

ABSTRACT

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of John's disease (paratuberculosis) in ruminants which is characterized as a chronic progressive disease whose signs and clinical manifestations appear in the final phase of infection. In recent years, several studies and metaanálisis have revealed the existence of a relationship between MAP and Crohn's disease since in both there are many similarities. The hypothesis of MAP as a causative agent arose from the identification of this pathogen in patients with Crohn's disease. However, since then multiple studies have been carried out to verify this association, with variable results. MAP has a specific region of the lineage called LSP14 and LSP15, implicated in its pathogenicity and metal homeostasis. The metabolism of zinc could be dependent on pathogenicity, so in this thesis project an investigation of the interaction between the MAP3773c protein that has similar characteristics to the Fur proteins with genes found exclusively on the specific zinc responsive genomic island in MAP and containing a box of Zur, including the MAP3773c gene. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were performed for each of the probes of each gene, resulting in an interaction of the protein with 16 of these probes. Some of the functions of the genes are synthesis of cobalamin, synthesis of polyketide synthase and proteins of the PE / PPE family, ABC transporters and homeostasis of metals involved in the virulence and pathogenicity of MAP. Just as it can possibly self-regulate your own transcription by interacting with the MAP3773c gene.

1. INTRIDUCCION

1.1. *Mycobacterium avium*

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) incluye 4 subespecies, es decir, *M. avium* subsp. *hominissius* (MAH), *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Rindi & Garzelli, 2014). A lo largo de los años se utilizaron otros taxonómicos para referirse a estas especies, es decir, *M. avium-intracellulare* (MAI), o para incluir otras micobacterias relacionadas, *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS) y *M. avium- M. intracellulare* clúster X (MAIX), para referirse a micobacterias no identificadas que no pertenecen a ninguno de los anteriores (Viljanen *et. al.*, 1993). Hasta la fecha, basado en pruebas fenotípicas y genotípicas, que confirmaron la estrecha relación de los diferentes organismos MAC, ha revelado la existencia de +una amplia variedad de organismos ambientales y animales asociados con diferentes grados de patogenicidad, preferencia del hospedador y distribución ambiental, de modo que 9 especies de micobacterias de crecimiento lento y un subconjunto adicional de aislamientos de clasificación indeterminada se incluyen en el complejo. (Tabla 1.1) (Rindi & Garzelli, 2014).

Tabla 1.1. El complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

Especies	Subespecie	Patogenicidad	Preferencia del anfitrión	Referencia
<i>M. avium</i>	Subsp. <i>avium</i>	Tuberculosis aviar	Aves	(Viljanen <i>et. al.</i> , 1993)
	Subsp. <i>hominissius</i>	Infecciones pulmonares, linfadenitis cervical, infecciones de tejidos blandos, infecciones diseminadas	Humano, porcino	(Viljanen <i>et. al.</i> , 1993)
	Subsp. <i>paratuberculosis</i>	Enfermedad de John	Rumiantes	(Thorel <i>et. al.</i> , 1990)
	Subsp. <i>silvaticum</i>	Enfermedad similar a la tuberculosis	Palomas de madera	(Thorel <i>et. al.</i> , 1990)

Continúa...

...Continúa

<i>M. intracellulare</i>	Infecciones pulmonares	Humano	(Pfyffer & Palicova, 2007)
<i>M. colombiense</i>	Infecciones diseminadas, linfadenopatía	Humano	(Murcia et. al., 2006)
<i>M. quimera</i>	Infecciones pulmonares	Humano	(Tortoli et. al; 2004)
<i>M. marseillense</i>	Infecciones pulmonares	Humano	(Ben Salah et. al., 2009)
<i>M. timonense</i>	Infecciones pulmonares	Humano	(Ben Salah et. al., 2009)
<i>M. boucherdurhonense</i>	Infecciones pulmonares	Humano	(Ben Salah et. al., 2009)
<i>M. vulneris</i>	Linfadenopatía, herida	Humano	(Van Soolingen et al., 1998)
<i>M. arosiense</i>	Osteomielitis	Humano	(Bang et. al., 2008)
"MAC-otros"	Infecciones pulmonares, infecciones diseminadas	Humano	(Smole et. al., 2002)

Debido a las limitaciones de la taxonomía micobacteriana basada en el fenotipo convencional, los organismos de hoy incluidos en la especie *M. avium* fueron considerados durante mucho tiempo como dos especies distintas, es decir, *M. avium* y *M. paratuberculosis* (Thorel et. al., 1990). A pesar de su estrecha relación taxonómica, las subespecies de *M. avium* representan organismos fenotípicamente diversos, cada uno dotado de características de patogenicidad específica y rango de hospederos, que van desde bacterias ambientales que causan infecciones oportunistas de pacientes porcos e inmunodeprimidos hasta patógenos principalmente de aves y otros animales (Rindi & Garzelli, 2014).

Las diferencias fenotípicas en *Mycobacterium avium* ssp. (MAC) se asocian con inserciones irreversibles y supresiones de fragmentos genómicos, llamados polimorfismos de secuencia larga (LSP). Por lo tanto, el genoma MAP comprende siete inserciones genómicas exclusivas del linaje específico: LSP2, LSP4, LSP11, LSP12, LSP14, LSP15, LSP 16 y una delección en LSP8. Varios genes ubicados

en estos LSP recientemente se han encontrado asociados con la virulencia (Eckelt *et. al.*, 2014).

1.1.1. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Es la bacteria más importante del complejo *avium* desde el punto de vista veterinario. Desde el punto de vista genético, MAP es una de las dos bacterias del complejo *avium* cuyo genoma ha sido secuenciado por completo, el de la cepa k10, constando de 4.829.781 pares de bases que forman un único cromosoma circular y codifican 4350 ORFs, 45 ARNt y un operón ARNr (Li *et. al.*, 2005). Para diferenciar MAP se ha utilizado la secuencia de inserción específica llamada IS900 aplicada en el análisis de polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP), estableciéndose diferencias entre cepas, a su vez clasificado en dos grupos que reflejan parcialmente su especificidad de hospedador: el tipo S también diseñado como tipo I, parece ser predominante en ovejas, mientras que el tipo C también conocido como tipo II, representa el tipo más ampliamente reconocido para varios hospedadores, generalmente bovinos y caprinos (Gutierrez Duprat, 2005; Rindi & Garzelli, 2014; Viale *et. al.*; 2016).

Son bacilos (0.5 x 1.5 μ m), gram positiva, ácido alcohol-resistente, inmóvil, aerobio e intracelular facultativo, no forma esporas, posee pared celular cerosa rugosa con una estructura trilaminar, compuesta densamente por una mezcla cerosa de lípidos únicos y polisacáridos, particularmente, ácidos micólicos, pero carece de antígenos de glicoproteínas sobre su superficie (Sánchez Govea, 2012; Salgado A. & Colins). Esta clase de pared celular facilita la resistencia de *Mycobacterium* a los factores físicos y desinfectantes comunes (Sánchez Govea, 2012).

Esta envoltura está constituida por tres componentes:

-**Capsula:** cuya síntesis parece estar controlada por mecanismos reguladores dependientes del huésped en micobacterias patógenas.

-Pared celular: formada por unión covalente entre peptidoglicano, arabinogalactano y los ácidos micólicos.

-Membrana citoplasmática: cuya composición es similar a la de otras bacterias.

Las características de su pared celular, su tendencia a formar grupos y el tener una actividad metabólica extremadamente baja, explicarían la gran resistencia de esta bacteria frente a condiciones ambientales adversas, pudiendo perdurar por más de un año en el medio ambiente (Salgado A. & Colins).

Todas las especies de *Mycobacterium*, a excepción de MAP, producen micobactina, un agente quelador de hierro. Debido a que el hierro es requerido para la replicación, MAP es considerado un patógeno obligado de las células mamíferas, donde el hierro se encuentra fácilmente disponible para el organismo y la micobactina no es necesaria (Salgado A. & Collins, 2013).

Crece a 37°C en los medios convencionales, como el de Lowenstein-Jensen, en el que se recupera en un período de 3 o 4 semanas, con una apariencia de tapiz fino, no cromógeno, con pequeños matices de transparencia, opaco o rugoso que, en los modelos experimentales, se ha relacionado con la patogenicidad. La tinción de Ziehl-Neelsen de las colonias es bastante típica: son bacilos muy finos, de longitud irregular y aparecen sueltos, sin formar cordones ni agrupaciones (Santos & Gobernado, s.f.).

Se multiplican muy lentamente y son muy difíciles de cultivar, requiere en algunas ocasiones, varios meses para obtener colonias visibles. La mayoría de las cepas no son fotocromógenas y el crecimiento de algunas se estimula con piruvato. Carece de fosfatasa alcalina y es resistente a la D-cicloserina y la ansamicina. Los requerimientos nutricionales para el cultivo de MAP son similares a los del resto de micobacterias. Aunque generalmente no necesitan factores de crecimiento, algunos componentes como detergentes, triglicéridos, ácidos

palmítico y oleico, albúmina sérica bovina, yema de huevo o dióxido de carbono, pueden potenciarlo. La fuente de carbono más utilizada tradicionalmente es el glicerol, aunque el piruvato puede ser el elegido en algunas circunstancias. Pueden también utilizar hidrocarburos, especialmente alcanos (excepto metano), y los ácidos grasos derivados, así como alcoholes, cetonas, y ácidos mono-, di- o tricarboxílicos. La asparagina es la fuente de nitrógeno preferida, sin embargo, ésta puede ser sustituida por glutamina, glutamato, ácido aspártico, o sales de amonio. Entre los minerales, los macroelementos que requieren en grandes cantidades son potasio, magnesio, azufre y fósforo. Mientras, los microelementos y oligoelementos que cabe destacar son hierro, zinc, manganeso, y molibdeno, muchas veces añadidos al medio como impurezas (Ratledge, 1982).

1.1.1.1. Enfermedad de John

La paratuberculosis (PTBC) o enfermedad de John fue descrita por primera vez en 1895 cuando H. A. John y L. Frothingham hallaron la presencia de microorganismos ácido- alcohol resistente a partir de frotis de material intestinal, durante un brote de diarrea bovina en Alemania, sin poder identificar taxonómicamente al agente. En 1923 Bergey y col. otorgaron el nombre de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP) al microorganismo causante de la enfermedad, como en la actualidad se le identifica (MV Gilardoni & Dra. SL, 2008).

Este agente etiológico ha sido investigado en un amplio rango de especies domésticas y de ambientes ecológicos de fauna silvestre y parques zoológicos, como cabras, ciervos blancos, ciervos rojos, alces, muflones, camellos, ovinos, gnus, búfalos, llamas, pero en la especie que más se ha estudiado es en el bovino (Cirone *et. al.*, 2007).

La paratuberculosis cursa como una enteritis granulomatosa infecciosa de manera subclínica con un largo periodo de incubación, cuyos signos y manifestaciones clínicas se presentan en la fase final de la infección. Estos solo

representan la parte visible del problema ya que existe una proporción del hato que no muestran signos aparentes, aunque son portadores de la enfermedad (Ortiz *et. al.* s.f.).

La fuente primaria de infección son los bovinos adultos infectados y los rodeos que los albergan. Los animales clínicamente enfermos excretan en forma masiva al bacilo en el excremento, la concentración bacteriana en materia fecal puede sobrepasar valores de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/g (5), siendo ésta la principal vía de transmisión oro-fecal para los animales (Martínez *et. al.*, 2012). MAP puede sobrevivir por largos períodos de tiempo en el medio ambiente contaminando diversas superficies (Salgado A. & Collins, 2013).

Otra forma en la que los animales se llegan a infectar es durante la lactancia, por la eliminación directa del microorganismo a través de la leche, además de la contaminación de la ubre con heces, como también de pasturas y agua contaminada con materia fecal y, en menor porcentaje, a través de placenta y semen (MV Gilardoni & Dra. SL, 2008; Martínez *et. al.*, 2012). La enfermedad se caracteriza por una enteritis crónica, cuyos síntomas son: diarrea, pérdida de peso aunque el apetito se mantiene, disminución de la producción láctea, edema submandibular y desmejoramiento corporal progresivo que conduce, eventualmente, a la muerte del animal infectado (Cirone *et. al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2012).

Los animales más susceptibles son los terneros menores de 30 días, si bien los animales de más edad pueden infectarse dependiendo de su condición sanitaria y de la carga bacteriana (MV Gilardoni & Dra. SL, 2008). Existen también portadores asintomáticos considerados como infectados subclínicamente (Cirone *et. al.*, 2007). Se estima que por cada caso clínico hay 25 casos subclínicos; de ahí la importancia de contar con pruebas de diagnóstico que puedan detectar a los animales infectados (Martínez *et. al.*, 2012).

Se especula que sólo el 10%-15% de animales infectados sobreviven al periodo clínico, pues la mayoría es enviado a sacrificio debido a la disminución en su productividad (MV Gilardoni & Dra. SL, 2008).

A pesar que la paratuberculosis es una enfermedad que se reconoce desde hace más de un siglo y no había mostrado una presencia preponderante en las explotaciones rumiantes, ha incrementado su importancia en los últimos años dependiendo de los avances que se hacen en el control de otras enfermedades, como brucelosis y tuberculosis (Sánchez Govea, 2012).

La paratuberculosis es endémica a nivel mundial, con altos niveles de prevalencia, fuerte impacto económico e importancia en Salud Pública (MV Gilardoni & Dra. SL, 2008). Es una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Su identificación es de declaración obligatoria y debe ser notificada a la OIE (MV Gilardoni & Dra. SL, 2008).

Se estima que la paratuberculosis no ha alcanzado su distribución potencial y continua expandiéndose. En México, Unzueta en 1936, informa la presencia de esta enfermedad en bovinos lecheros, utilizando como método de diagnóstico la aplicación de johnina y tuberculina aviar y también al observar el bacilo al microscopio. El aislamiento del microorganismo a partir de muestras de ganglios mesentéricos e intestino delgado se realizó en 1978. Las dificultades en su diagnóstico han limitado su conocimiento limitado de su distribución geográfica y hoy en día existe en México un creciente interés en conocer más sobre la presencia de la enfermedad y poner en práctica las alternativas para su control (Sánchez Govea, 2012).

1.1.1.1.1. Distribucion geografica

La paratuberculosis se puede encontrar en todo el mundo. Se ha probado que solamente Suecia y algunos estados de Australia estan libres de le enfermedad (Rovid Spickler, 2010).

En México se han realizado diversos estudios en rastros y se ha determinado una gran prevalencia en el ganado ovino y caprino. Se conoce que en 16 estados del pais existen frecuencias del 9%, 19.72% y 36% en bovinos, caprinos y ovinos respectivamente, lo que indica su distribucion en el territorio nacional en pruebas realizadas a mas de 7,000 muestras (Chávez, 2010).

1.1.1.1.2. Patogenia

Las proteinas de la familia PE/PPE (dominios de prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico) son específicas de micobacterias y en MAP hay un total de seis proteinas PE y 36 proteinas PPE homologas a las descritas en el genoma de *M. tuberculosis* y las cuales comprenden tan solo un 1% de la totalidad del genoma de MAP (Li *et. al.*, 2005).

Estas proteinas PE/PPE estan expresadas en la superficie celular de MAP y son asociadas a la posible variación antigenica y como consecuencia una interferencia en la respuesta inmune del hospedador (Cole *et. al.*, 1998). Algunas de estas proteinas PPE se han visto involucradas en la virulencia de cepas MAP en ratones y en el crecimiento intracelular de este microorganismo en el interior de los macrofagos (Li *et. al.*, 2005).

La bacteria entra a través del tejido linfoide del intestino delgado, uno de sus componentes son las placas de Peyer principalmente, por mediación de celulas M epiteliales, que son importantes en la presentación y transporte de antigenos a células inmunocompetentes (Sigurdardóttir *et. al.*, 2001). Seguido de una fagocitosis por los macrófagos residentes. Una vez activados sensibilizan los linfocitos T (TH1 y TH2) que activan a su vez la respuesta inmunologica. Los

linfocitos T cuentan con receptores altamente específicos que reconocen a los antígenos en asociación con glicoproteínas de las membranas de los macrófagos, con la subsecuente síntesis y liberación de interleucina 1 (IL-1) por parte de los macrófagos. Posteriormente, esta IL-1 estimula a los linfocitos T para producir IL-2, la cual es responsable de la proliferación de estos linfocitos. Una vez que los linfocitos T se han activado, se facilita la actividad y diferenciación de los macrófagos por parte de otras interleucinas, como el interferón- γ (IFN). En la paratuberculosis, se reconocen dos formas histopatológicas de la enfermedad, que dependen directamente del tipo de respuesta inmune que esté predominado (Chávez, 1998).

1.1.1.1.2.1. Fase tuberculoide o paucibacilar

Los TH1 producen IL-2, IFN- γ , factor de necrosis tumoral (TNF- α) y factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Valentin-Weigand & Goethe, 1999). Éstas producen la activación y atracción de los macrófagos, lo que facilita la destrucción de los microorganismos y controla el avance de la infección (Bassey & Collins, 1997). Además, se activa la formación de granulomas alrededor de la infección, debido a sustancias como el factor de necrosis tumoral, aislando la infección y previniendo su propagación (Saunders & Cooper, 2000). Esta fase puede durar meses a años, donde MAP permanece contenido dentro de los macrófagos y granulomas, logra sobrevivir dentro de los compartimientos fagosomícos, evitando la maduración de éstos e incluso reprogramar el patrón de expresión genética de los macrófagos, lo que incrementa sus oportunidades de supervivencia y patogénesis en el hospedero (Chiodini R., 1996; Victoria-Gasteiz, 2007).

También se puede clasificar como fase paucibacilar, por hallarse un infiltrado tisular linfocítico con escasa o nula presencia de micobacterias en el interior de los macrófagos tisulares (Rivera, 2015). Algunas veces, al revisar los registros de producción del ganado lechero, es posible confirmar la disminución del rendimiento lácteo sin razón aparente.

1.1.1.1.2.2. Fase lepromatosa o multibacilar

Tras el fallo del sistema inmune de tipo celular, se produce una proliferación bacteriana y un paso progresivo hacia la respuesta de tipo TH2. En esta fase, hay una producción de IL-4, IL5, IL-6 e IL-10 por los linfocitos CD4+ TH2 que suprime la respuesta de tipo TH1 (Coussens, 2004). Esto favorece la multiplicación de linfocitos B, produciéndose anticuerpos. Durante esta fase hay una disminución de la respuesta celular y un aumento de la respuesta humoral, al mismo tiempo que hay una multiplicación de MAP (Lepper *et. al.* 1989).

Este hecho tiene como consecuencias la progresión de la infección, el desarrollo de la patología y la proliferación bacteriana. Esta fase también se denomina fase multibacilar, por la elevada presencia de bacilos en el interior de los macrófagos tisulares. Debido a la gran presencia de células inflamatorias se produce un engrosamiento de la pared intestinal, perdiendo ésta su funcionalidad, dándose un síndrome de malabsorción y una enteropatía con pérdida de proteínas, provocando diarrea mas o menos intermitente, pérdida del peso y condición corporal progresiva (Tiwari *et. al.*,2006).

Durante esta fase puede haber una diseminación del microorganismo fuera del tracto gastrointestinal, dando lugar a lesiones granulomatosas en hígado, riñón, glándula mamaria y otros órganos (Ayele *et. al.*, 2004).

1.1.1.1.3. Diagnóstico

Entre las técnicas de diagnóstico de la paratuberculosis, se pueden diferenciar las histopatologicas que identifican las lesiones tisulares, las etiologicas que detectan la presencia de microbacteria en cultivo fecal, cultivo de tejidos, cultivo de muestras ambientales y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y las inmunologicas que tratan de detectar la respuesta inmune específica del hospedador como IFN- γ , intradermorreacción y prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) (Victoria-Gasteiz, 2007), (SAG). Los métodos más ampliamente utilizados *in vivo* son el cultivo fecal y el ELISA, aunque otros como

la detección de IFN- γ van tomando mayor protagonismo ya que trata de identificar animales infectados antes de que presenten sintomatología clínica. No obstante, los métodos actuales más específicos como la histopatología o el ELISA adolecen de falta de sensibilidad precisamente por su ineficacia en la identificación de animales con paratuberculosis subclínica, mientras que los más sensibles como el cultivo, la estimulación de la producción de IFN- γ o la PCR parecen ser demasiado inespecíficos al menos en términos prácticos de predicción de la enfermedad clínica (Victoria-Gasteiz, 2007).

1.1.1.1.4. Enfermedad de Crohn

En los últimos años, diversos estudios y metaanálisis han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, y la enfermedad de Crohn, que si bien todavía no puede ser considerada como etiopatógena, sí plantea ciertas preguntas a la hora de entender por qué se produce la enfermedad (Forteza Ormaechea et. al.). En ambas enfermedades hay muchas, por ejemplo la localización de las lesiones (íleon y colon, nódulos linfáticos mesentéricos, ano y recto), las características macroscópicas (apariciencia microscópica, edema parietal y aspecto de la mucosa), la apariciencia microscópica (afectación transmural, agregados linfoides, granulomas, ausencia de caseificación), síntomas (diarrea y pérdida de peso) y manifestaciones extra intestinales (granulomatosis hepática) (Ortiz et. al. s.f.).

La enfermedad de Crohn es caracterizada por una inflamación transmural que puede involucrar segmentos de todo el tracto gastrointestinal, desde la boca al ano. El principal síntoma es la diarrea crónica e intermitente, usualmente acompañada de hemorragia, heces fétidas, fiebre, dolor abdominal, fatiga, anorexia y pérdida de peso (Retamal M. et. al., 2011; Cirone et. al., 2007). Se han notificado molestias en la piel, articulaciones, ojos, hígado, retraso en la aparición de la pubertad y problemas de crecimiento (Cirone et. al., 2007). Afecta a jóvenes entre las edades de 16 y 25 años, aunque también puede ocurrir en la primera infancia o más adelante en la vida. La mayoría de los pacientes con enfermedad

de Crohn tienen un curso crónico intermitente y el tratamiento es multifacético, incluidos agentes antidiarreicos y antiinflamatorios para tratar los síntomas, medicamentos inmunosupresores destinados a la remisión de la enfermedad y cirugía para eliminar el intestino enfermo o aliviar complicaciones como obstrucciones (Grant, 2005).

La patogénesis de la enfermedad de Crohn comprende un grupo de patologías crónicas cuya etiología multifactorial no está aún esclarecida del todo (Sepúlveda *et. al.*, 2008). La enfermedad de Crohn podría deberse a: i) una infección persistente, posiblemente con micobacterias (especialmente MAP), el virus del sarampión, *Listeria* spp. y *Escherichia coli*; ii) defectos de la barrera mucosa del intestino que permite la absorción de macromoléculas inmunogénicas, dietéticas y bacterianas; iii) fenómenos de desgranulación del sistema inmune con pérdidas de tolerancia, activadores celulares agresivos y trastornos de apoptosis; iv) factores genéticos de susceptibilidad individual; o v) una combinación de algunos o todos los anteriores (Grant, 2005). La combinación de algunos o de todos estos factores sería necesaria para producir la enfermedad en humanos (Cirone *et. al.*, 2007).

La hipótesis de MAP como agente causal surgió a partir de la identificación de este patógeno mediante aislamiento directo desde áreas intestinales afectadas de pacientes con la enfermedad de Crohn. Esta cepa clínica resultó ser patógena también para animales de laboratorio y logró reproducir la paratuberculosis en rumiantes inoculados experimentalmente (Chiodini *et. al.*, 1984). Sin embargo, desde entonces múltiples estudios han sido realizados para comprobar esta asociación, con resultados variables en donde no siempre se ha logrado la identificación de MAP en áreas comprometidas de pacientes enfermos y a la inversa, también se ha detectado en zonas sanas (Grant, 2005).

A pesar de que MAP puede infectar diversos tejidos de los rumiantes, la leche constituye el mayor riesgo para la transmisión de la bacteria al ser humano, ya sea por la contaminación de la glándula mamaria desde la sangre, por la mezcla de

leches limpias e infectadas a nivel de los estanques de acopio, o bien por la contaminación de la leche con heces provenientes de animales diseminadores, debido a que podría tener cierto grado de resistencia a los procedimientos de pasteurización (63°C en 30 minutos), incluso es capaz de sobrevivir hasta 90°C en segundos, siendo el patógeno más resistente al calor en los alimentos (Retamal *et. al.*, 2011; Grant *et. al.*, 1996).

La preocupación por el posible riesgo en salud pública, ha promovido la realización de estudios sobre la presencia de MAP en la cadena alimentaria humana. La presencia de esta micobacteria ha sido investigada principalmente en leche, queso y agua como posibles vías de transmisión a la especie humana (Cirone *et. al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1. Control de la concentración de metales intracelulares

Los metales de transición como el hierro y el zinc son factores clave en numerosos procesos biológicos como cofactores en procesos enzimáticos y catalíticos para proteínas o forman parte de estructuras anatómicas celulares. Por lo tanto, son importantes para la homeostasis metabólica y la viabilidad de las células eucariotas y procariotas. Sin embargo, una elevada cantidad intracelular de estos elementos puede tener un gran potencial tóxico o incluso letales sobre las células, ya sea por inhibición de ciertos procesos metabólicos o por acumulación de radicales libres generados en los procesos de reducción en los que participan (Eckelt *et. al.*, 2014). Por ello, las células han desarrollado mecanismos específicos de captación así como sistemas de excreción para mantener una homeostasis equilibrada de los metales en el interior de la célula.

El intercambio de éstos metales también puede ser utilizado por las células como mecanismo de defensa inespecífico frente al desarrollo de procesos infectivos. Estos mecanismos deben ser regulados ente sí, tomando en cuenta las condiciones del entorno, tanto de proteínas que realizan funciones en específico, como también de reguladores que controlan la expresión de éstas según las necesidades de la célula (Campoy Sánchez, 2002).

2.1.1. Zinc

Una baja concentración libre de zinc dificulta la proliferación bacteriana. Sin embargo, un incremento de la concentración de zinc resulta tóxico para los microorganismos, debido a que compite con otros metales por la unión a sitios activos de enzimas (Silver *et. al.*, 1989).

Por ello, las bacterias han desarrollado mecanismos específicos implicados en la captación y exportación del zinc hacia el exterior de la célula, ambos para

mantener las concentraciones optimas de zinc intracelular (Campoy Sánchez, 2002).

2.1.1.1. Mecanismo de captación de zinc

Los mecanismos de captación de zinc se dividen fundamentalmente en dos grupos: los de alta afinidad, expresados cuando la presencia de zinc es limitante en el ambiente; y los de baja afinidad, que suelen expresarse constitutivamente pero que no son suficientes para proporcionar los niveles requeridos en condiciones limitantes.

2.1.1.1.1. Mecanismo de captación de zinc de alta afinidad

2.1.1.1.1.1. Transportadores del tipo ABC

Cuando existe una deficiencia de zinc, éstos transportadores aparecen en la superficie celular y son los responsables de proporcionar una alta especificidad a los transportadores de los que forman parte (Campoy Sánchez, 2002).

Uno de los principales sistemas de captación de Zn^{2+} de alta afinidad es el conocido como ZnuABC (zinc uptake), que fue descrito en *E. coli*. Este sistema es un transportador de tipo ABC compuesto por tres proteínas: proteína periplásmica de unión al Zn^{2+} (ZnuA); proteína integral de membrana citoplasmática (ZnuB); y proteína con actividad ATPasa (ZnuC). De las tres proteínas que forman este transportador, la más estudiada es la que se une directamente al metal. Si bien el conjunto de estudios llevados a cabo no descartan tampoco la posibilidad de que esta proteína pueda ser excretada al exterior para actuar como captador externo de zinc, de forma análoga a los sideróforos (Hantke, 2001).

2.1.1.1.2. Mecanismo de captación de zinc de baja afinidad

La mayoría de los sistemas implicados en la captación de Zn^{2+} de baja afinidad se encuentran activos por debajo del umbral de la concentración tóxica de este metal, cuando los sistemas de alta afinidad están reprimidos (Hantke, 2001). Hasta el momento se han descrito diversos transportadores de zinc implicados en

la captación de este metal como ZupT y Pit en *E. coli* y la proteína YciC en *B. subtilis*.

2.1.1.1.3. Regulación de la captación de zinc

El sistema de regulación de las concentraciones intracelulares de zinc presenta una serie de reguladores transcripcionales que actúan como sensores de este metal, regulando la expresión de los genes que controlan los procesos de captación así como los procesos de expulsión cuando son necesarios (Gaballa & Helmann, 1998). Los reguladores Zur forman parte de los sistemas de regulación de la captación de zinc.

2.1.1.1.3.1. La proteína Zur

La homeostasis del zinc está fuertemente regulada por el regulador de la familia Fur en muchas bacterias. Las proteínas Fur incluyen diversos metalorreguladores, tales como Fur (Fe^{2+}), Zur (Zn^{2+}) o Mur (Mn^{2+}), así como sensores de estrés peróxido (PerR) y sensores de la disponibilidad de heme (Irr).

Debido a la similitud que presentan la proteína Zur con la proteína Fur, se cree que muchos de los genes catalogados como Fur pueden ser en realidad genes Zur. Cabe destacar que en la proteína Zur se encuentran conservadas las cuatro cisteínas presentes en su análoga Fur, incluyendo las dos cisteínas de unión al zinc presentes en Fur (Campoy Sánchez, 2002).

Zur es una proteína de localización citoplasmática que se encarga de la regulación transcripcional de algunos sistemas de importación de zinc al interior de la célula. De hecho, se ha demostrado su implicación directa en la regulación de la expresión del sistema de transporte de zinc de alta afinidad ZnuABC de *E. coli* o de los dos sistemas de captación de zinc de alta y baja afinidad de *B. subtilis* (Gaballa & Helmann, 1998).

La proteína Zur es un homodímero que, independientemente de la unión de Zn^{2+} , cada dímero de Zur es capaz de interaccionar como mínimo con 2 átomos de zinc. Esta interacción, igual que pasa con otros metalorreguladores, da lugar a una serie de cambios conformacionales que permiten la unión del regulador al DNA. Además, la presencia de quelantes de zinc inhiben completamente la unión de la proteína Zur a dicha región del DNA bloqueando así la transcripción de los genes a cuyos promotores es capaz de unirse (Patzner & Hantke, 2000). Zur es capaz de actuar como un activador transcripcional reconociendo la secuencia del promotor de un gen implicado en la exportación de zinc, secuencia totalmente diferente de la que suele reconocer este regulador para ejercer su papel de represor en los transportadores de metales (Huang *et. al*; 2008).

2.1.1.1.4. Otros reguladores de la concentración intracelular de zinc

Los sistemas de transporte descritos presentan reguladores transcripcionales propios:

2.1.1.1.4.1. ZntR

Es el regulador del sistema de exportación de cationes que está codificado por *ZntA*. Se ha descrito en *E. coli* y pertenece a la familia MerR-like, que incluye otros reguladores transcripcionales de procariotas relacionados con la resistencia a mercurio, con sistemas de eflujo de amplio espectro de *B. subtilis*, reguladores transcripcionales de *S. coelicolor* o el regulador GinR de *B. cereus* (Brocklehurst *et. al.*, 1999).

2.1.1.1.4.2. SmtB

El mantenimiento de la homeostasis del zinc en las micobacterias está regulado por el sistema metarregulador SmtB-FurB. Ambos reguladores son co-transcritos de un operón, pero trabajan de manera antagónica. SmtB es un sensor de metal de la familia ArsR, que detecta los iones de zinc libres y regula la mayoría de los sistemas de exportación de zinc. Por lo tanto, estas proteínas también regulan los genes de estrés oxidativo y los determinantes de virulencia de

las bacterias patógenas que son necesarios para iniciar la expresión de factores de virulencia (Stratmann *et al.*, 2004; Escolar *et al.*, 1999). Por lo tanto, se unen a la secuencia consenso en los promotores diana, previniendo la unión a la ARN polimerasa y la transcripción del gen diana (Hantke, 2002).

2.1.1.1.4.3. ZiaR

Un regulador similar al anterior que controla la expresión del sistema de expulsión de zinc codificada por ZiaA e identificada en *Synechocystis* (Campoy Sánchez, 2002).

2.1.1.2. Mecanismo de exportación de zinc

Las bacterias han desarrollado también mecanismos de expulsión de zinc hacia el exterior de la célula con la finalidad de evitar altas concentraciones de este metal en el citoplasma, previniendo así sus posibles efectos tóxicos.

En *E. coli* se han descrito dos tipos de mecanismos de expulsión de zinc, uno perteneciente a la familia de las ATPasas de tipo-P y otro relacionado con la familia de facilitadores de la difusión de cationes, ambas implicadas no solo en el mecanismo de zinc sino también de otros metales.

2.1.1.2.1. La ATPasa ZntA

La ATPasa de tipo-P responsable del transporte de Zn^{2+} y de Cd^{2+} en *E. coli* se conoce como ZntA (Zinc tolerance) (Beard, Hashim, Membrillo-Hernandez, Hughes y Poole, 1997). Se llevó a cabo estudios donde presentaban sensibilidad a diferentes metales, aunque en menor grado que la observada para zinc (Beard *et al.*, 1997).

La regulación del gen ZntA la realiza la proteína ZntR, que permite su transcripción cuando la concentración de Zn^{2+} o de Cd^{2+} baja. En presencia de estos metales, la proteína ZntR se convierte en un regulador transcripcional que cambia la conformación de la región promotora del gen ZntA, convirtiéndolo en un

mejor sustrato para la RNA polimerasa. ZntR es un regulador similar a MerR, que interviene en el sistema de detoxificación de Hg^{2+} (Brocklehurst *et. al.*, 1999).

2.1.1.2.2. Transportadores CDF

La proteína CzcD, presente *W. metallidurans*, es miembro también de la familia CDF y es uno de los sistemas que se encarga del transporte de Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} a través de la membrana citoplasmática. El análisis del genoma de *W. metallidurans* revela la presencia de dos genes que codifican CDF's que participan principalmente en la detoxificación de Fe^{2+} aunque también interviene en la resistencia contra Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} (Munkelt, Grass & Nies, 2004).

Otro miembro de la familia de transportadores CDF es la proteína ZntA, identificada en bacteria *S. aureus*, que presenta un 38% de identidad con la proteína CzcD de *W. eutropha* (Hantke, 2001).

La vinculación del gen ZitB al mecanismo de zinc se hizo en función de la similitud de la secuencia de su producto con otras proteínas pertenecientes a la familia de facilitadores de difusión de catión (CDF) presentes también en eucariotas que transporta Zn^{2+} hacia el exterior de la célula y cuya expresión está específicamente inducida por el catión (Grass *et. al.*, 2001).

ZntA y ZitB confieren resistencia a elevadas concentraciones de zinc cuando son sobre producidas por *Saccharomyces cerevisiae* (Campoy Sánchez, 2002). Esta resistencia parece ser debida a la expulsión de metales hacia el exterior. Sin embargo, los mutantes ZitB no presenta una mayor sensibilidad a zinc, por ello, se hipotetiza que el transportador ZntA es el responsable del mecanismo de exportación de zinc cuando éste se encuentra a concentraciones elevadas, mientras que ZitB sería un sistema de control de la homeostasis cuando los niveles de este metal son más bajos (Grass *et. al.*, 2001).

2.1.1.3. Isla de patogenicidad sensible al zinc en MAP

Se ha identificado una isla genómica sensible al zinc de aproximadamente 90kb única en MAP, donde están ubicados LSP 14 y LSP 15, presentes exclusivamente en MAP y no en otras micobacterias. Estos polimorfismos de secuencia larga, codifican proteínas que están implicadas en la homeostasis del metal y que están asociados con la virulencia (Eckelt *et. al.*, 2014).

LSP 14 comprende (MAP3725-3764c), un grupo intermedio con un alto número de genes para las proteínas ribosómicas (MAP3765-3770) mientras que LSP 15 comprende (MAP3771-3776c) que contiene regiones de los genes de MAP3776-4c que codifican un tipo de transportador ABC, un casete de unión al ATP, un regulador de la captación de metal del gen MAP3773c que funciona como un factor de transcripción, y el MAP3772c implicado en la síntesis de la cobalamina y un grupo de genes adyacentes 3778-3788. Este último está precedido por una caja Zur y codifica para un sistema de secreción de tipo ESX-VII, que medía el transporte de virulencia asociada a las proteínas PE/PPE. Además, se demostró que es necesario para el metabolismo del hierro y zinc en Mtb, así como para la interacción huésped-patógeno (Eckelt *et. al.*, 2014).

2.1.1.3.1. Regulón de zinc

La isla genómica alberga los genes MAP3747c, MAP3770 y MAP3772c que están regulados por Zur (proteínas similares a CobW), que se inducen en gran medida. Las proteínas de esta familia están relacionadas con la homeostasis de zinc y se ha encontrado que están reguladas por Zur en otras bacterias que posiblemente constituyen transportadores o chaperonas de zinc de baja afinidad, que se utilizan para dirigir los iones de Zn^{2+} hacia la proteína adecuada (Eckelt *et. al.*, 2014).

Una comparación del regulón de zinc de MAP con el regulón Zur de Mtb, reveló una alta congruencia en donde los genes regulados por Zur se encontraron en la isla genómica de MAP, sin embargo se organizan en pequeños grupos dispersos

sobre el genoma. Además, algunos genes del regulón de Mtb no se encuentran presentes o no están regulados en MAP, lo que significa que otros genes que se encuentran en la isla genómica de MAP pueden sustituir sus funciones. También confirmaron el agrupamiento único de genes regulados de zinc en la isla genómica de MAP y solo un sitio predicho de unión a Zur se ubicó fuera de la isla genómica (MAP0497c-0489c) (Eckelt *et. al.*, 2014).

2.1.1.3.2. Proteína MAP3773c

La proteína MAP3773c tiene un peso molecular de 20.6 kDa, presenta características bioquímicas de la familia de proteínas Fur, actúa en la región promotora del gen autorregulando su propia expresión y se encuentra en la isla genómica de MAP (Ibarra, 2016). Por lo que en este proyecto nos hemos interesado en estudiar la proteína MAP3773c ya que se cree que regula la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo y almacenamiento de hierro y zinc, en respuesta al estrés oxidativo y los determinantes de virulencia de las bacterias patógenas, tiene una actividad metaloreguladora, y que posiblemente es un blanco para la elaboración de una vacuna o fármacos contra la enfermedad de John

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gracias a este tipo de estudios se ha comprobado la presencia de MAP en estos productos, así como la ineficacia de tratamientos como la pasteurización o la cloración a la hora de eliminar sus células viables (Vitoria-Gasteiz, 2007).

No existe un tratamiento conocido para esta enfermedad. Las medidas de control comprenden buenas prácticas sanitarias y de gestión, incluidos los “screenings”¹ en los animales nuevos para identificar y eliminar los animales infectados y una vigilancia constante de los animales adultos.

Existen algunas vacunas para esta enfermedad pero su uso está limitado a situaciones muy bien definidas y bajo un estricto control reglamentario. Se ha observado que la vacunación de terneros jóvenes ayuda a reducir la incidencia de la enfermedad pero no impide su propagación o la ocurrencia de nuevos casos en el rebaño. La vacunación puede interferir con los programas de erradicación basados en la detección y posterior eliminación de los animales infectados, y la vacunación contra la paratuberculosis, en particular, puede interferir también con las pruebas de detección de la tuberculosis bovina.

¹ Estrategia aplicada para detectar una enfermedad en individuos sin síntomas de tal enfermedad.

4. JUSTIFICACION

La vigilancia sanitaria de los animales es también una herramienta para seguir la evolución de una enfermedad, facilitar la lucha contra enfermedades o infecciones, aportar datos al análisis de riesgos, mejorar la sanidad animal y la salud pública y justificar la adopción de medidas sanitarias.

De acuerdo a los mecanismos de regulación de la caja Zur ya conocidos, se pretende identificar un mecanismo de regulación a nivel transcripcional en donde están implicados genes de la isla de patogenicidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

5. HIPOTESIS

5.1. Hipótesis nula:

MAP3773c participa en el mecanismo de regulación a nivel transcripcional de la región promotora de la caja Zur.

5.2. Hipótesis alternativa:

MAP3773c no participa en el mecanismo de regulación a nivel transcripcional en la región promotora de la caja Zur.

6. IMPACTOS

6.1. Científico

Las estrategias para erradicar la enfermedad basadas en programas de detección y eliminación de positivos, han fracasado principalmente por la falta de sensibilidad de los métodos de diagnóstico y la mala aplicación de las medidas higiénicas, lo que ha provocado grandes pérdidas. La estrategia de vacunación ha proporcionado resultados satisfactorios en relación con el mantenimiento de la producción y la economía del rebaño, sin embargo no es capaz de eliminar la infección.

6.2. Tecnológico

La inmunopatología de la PTB presenta una gran complejidad comparada con otras micobacterias como la tuberculosis bovina o como la tuberculosis en humanos, esto ha sido por la falta de conocimientos inmunopatológicos a nivel molecular y la principal razón es por la ausencia de herramientas que nos permitan descubrir algunos mecanismos claves como el metabolismo de hierro, tanto en la micobacteria como en el huésped y en caso particular en los macrófagos. Esto nos ayudaría a proponer posibles tratamientos y diseñar vacunas, que a la fecha no existen de forma comercial contra la paratuberculosis para uso doméstico en México.

6.3. Zoonotico

No se ha demostrado claramente que la paratuberculosis sea una zoonosis. Sin embargo, se ha detectado ocasionalmente el agente causal de la enfermedad de John (*M. paratuberculosis*) en algunos pacientes con la enfermedad de Crohn. La posible conexión entre MAP y la enfermedad de Crohn está basada en reportes de aislamientos esporádicos del organismo en tejidos de pacientes con Crohn y la detección por la secuencia de inserción IS900 de ADN. (Sanderson *et. al.*, 1992).

6.4. Económico-social

Las enfermedades y las zoonosis transmitidas por los alimentos constituyen un problema importante de salud pública y son una de las principales causas de disminución de la productividad económica, tanto en los países desarrollados como en los menos desarrollados. Las principales pérdidas económicas ocasionadas por la paratuberculosis se deben a la reducción de la producción láctea, al sacrificio prematuro y a la devaluación de los animales sacrificados para su venta.

La inspección de los animales destinados al sacrificio puede contribuir de manera valiosa a la vigilancia de enfermedades específicas que tienen consecuencias importantes para la sanidad de los animales y de las personas.

1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la función de la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el mecanismo de regulación a nivel transcripcional en la región promotora de caja Zur.

7.1. Objetivos específicos

- 1.- Transformar una cepa de *Escherichia coli* con el plásmido pRSET-MAP3773c e inducir la expresión de la proteína MAP3773c.
- 2.- Del extracto celular, purificar la proteína MAP3773c en columna de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) con zinc.
- 3.- Cuantificar la proteína de MAP3773c por método de Bradford.
- 4.- Diseñar las sondas de ADN de cada uno de los 20 genes de la región promotora del regulón de zinc.
- 5.- Estandarizar el método de Ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA).
- 6.- Realizar Ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA) para cada uno de los 20 genes de la región promotora del regulón de zinc con la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1. Transformación de una cepa de *Escherichia coli* con el plásmido pRSET-MAP3773c y sobreexpresión de la proteína MAP3773c.

Se utilizó para expresar la proteína, el plásmido pRSET-MAP3773c (*Invitrogen* TM) clonado por la M.C. Vanessa Martínez López en su trabajo de tesis de maestría (Enero 2015) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Campus Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California.

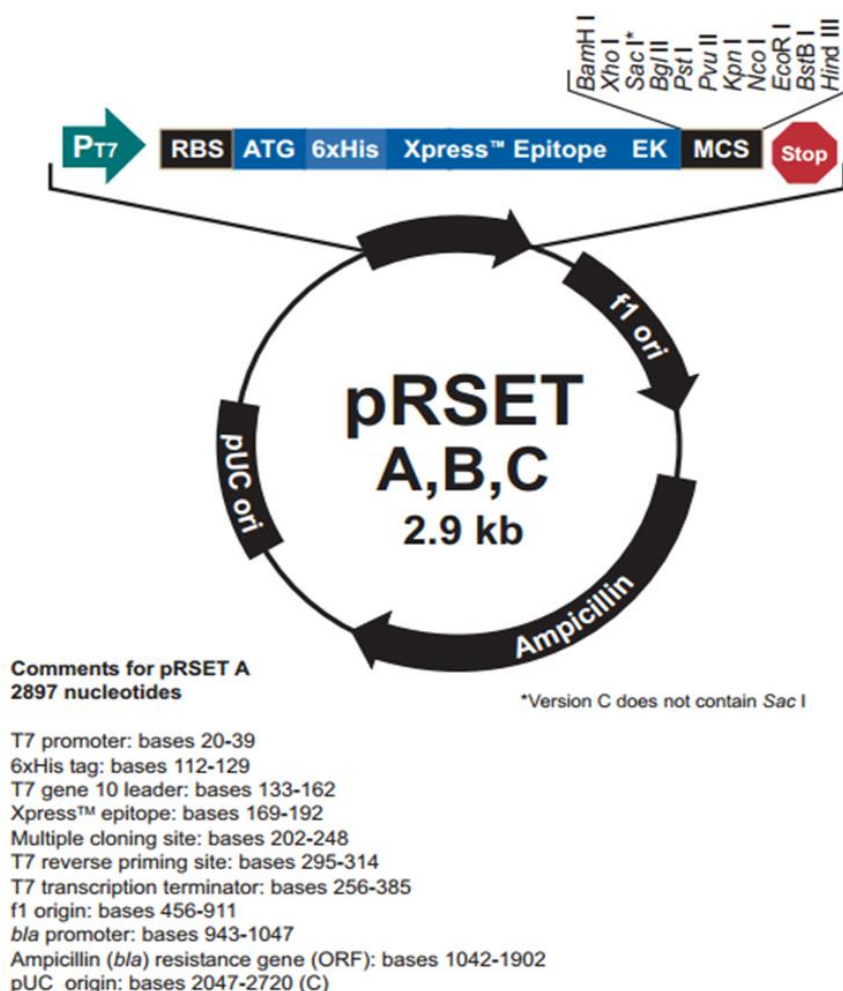


Imagen 1. Mapa del plásmido pRSET de *Invitrogen* TM

- 1.- Se cultivó la cepa en 15mL de caldo Luria Bertani estéril (NaCl 5.0 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L, hidrolizado enzimático de caseína 10.0 g/L, pH 7.5 $\pm$ 0.2) con una concentración final de 1 μ L/mL de ampicilina, 14-16 horas a 37°C con una agitación constante de 200 rpm.
- 2.- Se realizó una resiembra del cultivo bajo las mismas condiciones con un inóculo del 2% (20 mL/L), incubar hasta llegar a una lectura de densidad óptica entre 0.6-0.7 a 600 nm para inducir con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 100 mM.
- 3.- Se deja induciendo bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación, durante 4-6 horas.
- 4.- Se centrifugan los cultivos líquidos a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C (se descarta el sobrenadante), la biomasa celular se congela a -20°C.

8.2. Purificación de la proteína MAP3773c en columna de afinidad a metal inmovilizado con zinc.

Se utilizó el protocolo para la purificación de Fur-A de *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) proporcionado por el Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, España (Pellicer et. al., 2010).

8.2.1. Preparación de la columna cromatográfica de zinc.

- 1.- Se lavó la columna con abundante agua destilada.
- 2.- Se aplicó la cantidad conveniente de matriz hasta la altura de 10 mL tras empaquetamiento por gravedad, después se lavó con 10 volúmenes de columna de agua *milli-Q* (1 volumen de columna =10 mL) con un flujo de 3 mL/minuto (esta velocidad de flujo se utilizara en todo el procedimiento), para eliminar el etanol que viene como preservativo en la matriz (nunca se dejó secar la columna empaquetada).
- 3.- Se le aplicó 3 volúmenes de columna de solución de ZnSO₄ 0.25 M. Después de lavar con 10 volúmenes de columna de agua *milli-Q* para eliminar el exceso de metal no adherido.

4.- Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna con buffer de equilibrio (buffer de equilibrio= KCl 0.4 M en buffer A) (buffer A= 2 M cloruro de guanidinio, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH=8).

8.2.2. Purificación y lisis celular

1.- Se descongelaron 1.7 gramos de biomasa celular en hielo molido y se homogenizo 4.31 mL de buffer A con una concentración final de 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 3mM PMSF en isopropanol).

2.- El equipo que se utilizó fue *Ultrasonic Cleaner UC450* para lisar la biomasa celular durante 1 hora manteniendo una temperatura de 4°C.

3.- Se centrifugo el lisado 3 veces a 20,000 rpm por 20 minutos a 4°C, recuperando en cada ocasión el sobrenadante y descartando los restos celulares. Filtrar (0.80 - 0.22 µm). Se tomó una alícuota de 100 µL para realizar una electroforesis SDS-PAGE.

4.- El lisado se pasó a la matriz cromatografica, recolectándose y volviéndose a pasar en 2 ocasiones más por la columna. Se tomó una alícuota de 100 µL para realizar una electroforesis SDS-PAGE, el resto se etiqueto como "Volumen muerto".

5.- Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de buffer de lavado 1 ((NH₄)₂SO₄ 0.5 M en buffer A). Se tomó una alícuota de 100 µL para realizar una electroforesis SDS-PAGE, el resto se etiqueto como "Lavado 1".

6.- Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de buffer de lavado 2 (glicina 35 mM en buffer A). Se tomó una alícuota de 100 µL para realizar una electroforesis SDS-PAGE, el resto se etiqueto como "Lavado 2".

7.- Se eluyó utilizando un gradiente creciente de imidazol (0.1 M en buffer A). Iniciando con 15 mL de cada buffer en gradiente, recolectando 30 fracciones de 1 mL cada una, continuando luego con buffer de elusión solamente hasta coleccionar 45 fracciones de 1 mL. Guardar fracciones a 4°C hasta su uso.

8.- Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de agua *milli-Q*.

9.- Se conservó la columna en etanol al 20% a 4°C.

8.2.3. Análisis por electroforesis SDS-PAGE

- 1.- A las fracciones obtenidas de la purificación, se seleccionaron las fracciones 1, 6, 11, 16, 21, 26, 31, 36, 41 y 45 para precipitarlas y así eliminar el cloruro de guanidinio. Se tomaron 100 µL de cada muestra a concentrar y se le adiciono 100 µL de ácido tricloroacetico al 20%.
- 2.- Se incubaron en hielo molido durante 20 minutos; luego se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4°C descartando los sobrenadantes.
- 3.- Se lavó cada precipitado con 1 mL de etanol al 95% frio, centrifugando a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4°C descartando los sobrenadantes.
- 4.- Se dejó secar los precipitados a temperatura ambiente para después resuspender muy bien en 15 µL de agua libre de nucleasas.
- 5.- Se preparó un gel al 17% para la electroforesis SDS-PAGE de las fracciones precipitadas así como para el extracto muerto, lavado muerto, lavado 1 y lavado 2.

Tabla 1. Gel al 17% para proteínas.

Gel separador	
Acrilamida bisacrilamida 30%	2.40 mL
Tris 1.5M pH=8.8	1.50 mL
SDS 10%	0.12 mL
Agua destilada	2.0 mL
Persulfato de amonio 10%	0.045 mL
Temed	0.003 mL
Gel concentrador	
Acrilamida bisacrilamida 30%	0.33 mL
Tris 0.5M pH=6.8	0.50 mL
SDS 10%	0.04 mL
Agua destilada	1.22 mL
Persulfato de amonio 10%	0.025 mL
Temed	0.002 mL

- 6.- Para la reacción se tomaron 15 µL de cada muestra y se le agrego 15 µL de Regulador de muestra 2x. Posteriormente se hirvieron por 15 minutos a 100°C.
- 7.- Se utilizó *Sigma Marker wide range, mol wt 6,500-200,000 Da* como marcador de peso molecular en el primer carril del gel.
- 8.- Se cargaron las muestras en 2 geles en el siguiente orden:

Tabla 2. Orden en que se cargaron las muestras en los carriles del gel.

Carril	Gel 1	Gel 2
1	Marcador de peso molecular	Marcador de peso molecular
2	Extracto muerto	Fracción 26
3	Lavado muerto	Fracción 31
4	Lavado 1	Fracción 36
5	Lavado 2	Fracción 41
6	Fracción 1	Fracción 45
7	Fracción 6	
8	Fracción 11	
9	Fracción 16	
10	Fracción 21	

9.- Se utilizó Tris/Glycine/SDS buffer 1x de BioRad para llenar la cámara y se dejó correr a 130 volts hasta que las muestras llegaran al final del gel.

10.- Una vez finalizada la electroforesis, se dejó el gel en tinción para proteínas por 2 horas y posteriormente se destiño con decolorante para tinción de proteínas hasta observar bandas claras en el gel.

11.- Se ubicó las fracciones donde está la proteína eluida y se juntaron en un tubo de membrana de 20 kDa para concentrar la proteína.

12.- Recolectar proteína y dializar utilizando una membrana de diálisis con tamaño de exclusión de 10 kDa en un vaso de precipitado con buffer 10 mM acetato, ácido acético (para ajustar pH), pH5.5, se dejó en agitación magnética a 4°C durante toda la noche.

13.- Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en gel al 17% para la proteína obtenida después de diálisis bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

8.2.4. Cuantificación de la proteína MAP3773c

1.- Se realizó la cuantificación por la técnica de Bradford.

2.- Se preparó la curva patrón de albumina de 6 µL – 60 µL, de tal manera que el volumen final en cada tubo sea de 1 mL, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3. Curva patrón.

	1	2	3	4	5	6	Blanco
Proteína (µL)	6	10	15	20	30	60	-
Agua (µL)	794	790	785	780	770	740	800
Bradford (µL)	200	200	200	200	200	200	200

3.- Se preparó tres muestras problemas de la proteína MAP3773c:

Tabla 4. Curva de la proteína MAP3773c.

	7	8	9
Proteína (µL)	20	40	60
Agua (µL)	780	760	740
Bradford (µL)	200	200	200

4.- Se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm en el equipo *Thermo Scientific Genesys20*.

8.3. Obtención de las sondas de ADN de las secuencias de la región promotora del regulón de zinc en MAP3773c

8.3.1. Alineamientos y diseño de secuencias de nucleótidos

De acuerdo al artículo "*Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in Mycobacterium avium spp. paratuberculosis*", en donde se realizó una comparación del regulón de zinc de MAP con el regulón de zinc de Mtb dando como resultado que 23 genes del regulón de zinc de Mtb se encontraron en la isla genómica de MAP, sin embargo, 9 genes del regulón de zinc de Mtb no estaban presentes o regulados en MAP, lo que indica que otros genes de la isla genómica de MAP pueden sustituir sus funciones. Se encontró una homología conservada de 19 cajas Zur de Mtb en la región 5' de 12 genes del regulón de zinc de MAP que tienen un sitio de unión de FurB. Sólo una de las 19 cajas Zur se encuentra fuera de la isla genómica de MAP (MAP0489c). Estas 19 cajas demás pertenecen a la isla genómica que está vinculada a la virulencia y patogenicidad de la bacteria, tienen un sitio de unión a FurB. Además del gen MAP3773c para descubrir una posible autorregulación de la proteína MAP3773c.

1.- Se seleccionaron las 19 cajas Zur encontradas en la isla genómica en MAP.

- 2.- Se seleccionó también el gen MAP0489c que se encuentra fuera de la isla genómica en MAP pero cuenta con una región promotora de unión a FurB
- 3.- Para el diseño de las sondas se utilizó el software *Geneious 7.1.3*.
- 4.- Se diseñó la cadena complementaria para cada sonda
- 4.- Se mandaron a sintetizar (junto con la cadena complementaria) al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

8.4. Ensayo de cambio en la corrida electroforética

- 1.- Se preparó un gel de poliacrilamida al 8% para los ensayos de EMSA. Los reactivos utilizados para el gel, son los siguientes:

Tabla 5. Gel de acrilamida al 8%.

Acrilamida bisacrilamida 30%	1.33 mL
Agua destilada	2.0 mL
Glicerol 50%	0.635 mL
Buffer TBE 5x	1.0 mL
Persulfato de amonio 10%	40 µL
Temed	4 µL

- 2.- Se dejó polimerizar y se pre-corrió por 1 hora en una cámara de electroforesis con buffer TBE 1x a 90 volts a una temperatura de 4 °C.
- 3.- Las reacciones para los ensayos EMSA para cada una de las 20 sondas, se realizaron de la siguiente manera:

Tabla 6. Reacción para los ensayos EMSA.

	Control (µL)	Gen (µL)
Sondas 100 pmoles	1	1
Binding buffer 40x	1	1
Albumina 4 mg/µL	0.5	0.5
KCl 2M	0.5	0.5
Ficoll 40%	2.5	2.5
Agua (Libre de nucleasas)	14.5	-
Proteína MAP3773c	-	15

- 4.- Las reacciones se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente.

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

5.- Se agregó 10 µL de buffer de carga *Gel Loading Dye Blue (6x)* para cargarlas en el gel previamente hecho. Cargando en el primer carril el marcador de peso molecular.

6.- Correr a 75 volts por 4 horas a temperatura de 4 °C.

7.- Al finalizar, el gel se tiñió con bromuro de etidio por 1 minutos y se observó en luz ultravioleta.

9. RESULTADOS Y DISCUSION

9.1. Electroforesis SDS-PAGE para la purificación de la proteína MAP3773c

Imagen 2. Gel al 17% para proteínas.

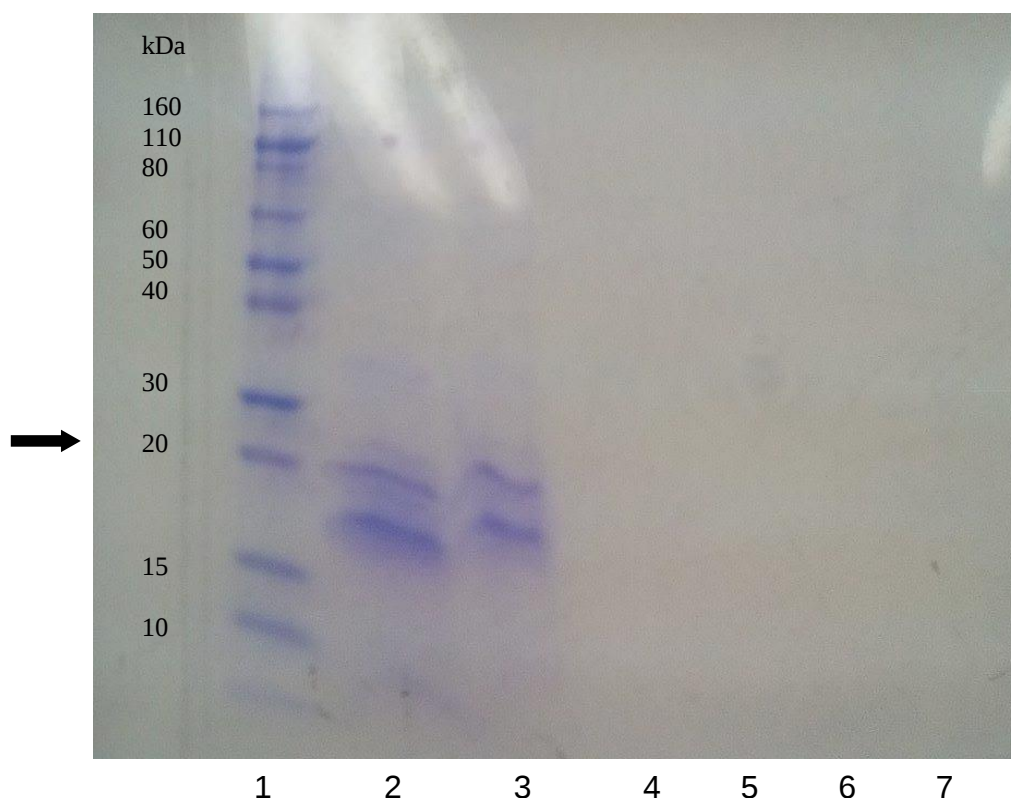


Imagen 2. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Extracto celular; Carril 3: Lavado muerto; Carril 4: Lavado 1; Carril 5: Lavado 2; Carril 6: Fracción 1; Carril 7: Fracción 6

En la imagen 2 se muestran los resultados de la purificación de la proteína MAP3773c, en donde se observan bandas en el carril 2 y 3 pertenecientes al extracto celular y lavado muerto, respectivamente, que de acuerdo con las bandas del marcador de peso molecular, tienen un peso de 20 kDa lo que indica que se trata de la proteína MAP3773c. Sin embargo, en el resto de los carriles no se observan bandas de ningún tipo, lo que sugiere que si estamos obteniendo la expresión de la proteína en los cultivos celulares pero el método de purificación no está dando los resultados deseados.

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

La cuantificación de la proteína por la técnica de Bradford nos dio una concentración de 0.2674 µg/µL. Una concentración muy baja que para realizar EMSA´s se necesitaría una gran cantidad de proteína.

9.2. Alineamientos

Para la obtención de éstos 20 alineamientos se utilizó el Software *Geneious 7.1.3*.

Imagen 3. Alineamientos de la región promotora del regulón de zinc de MAP

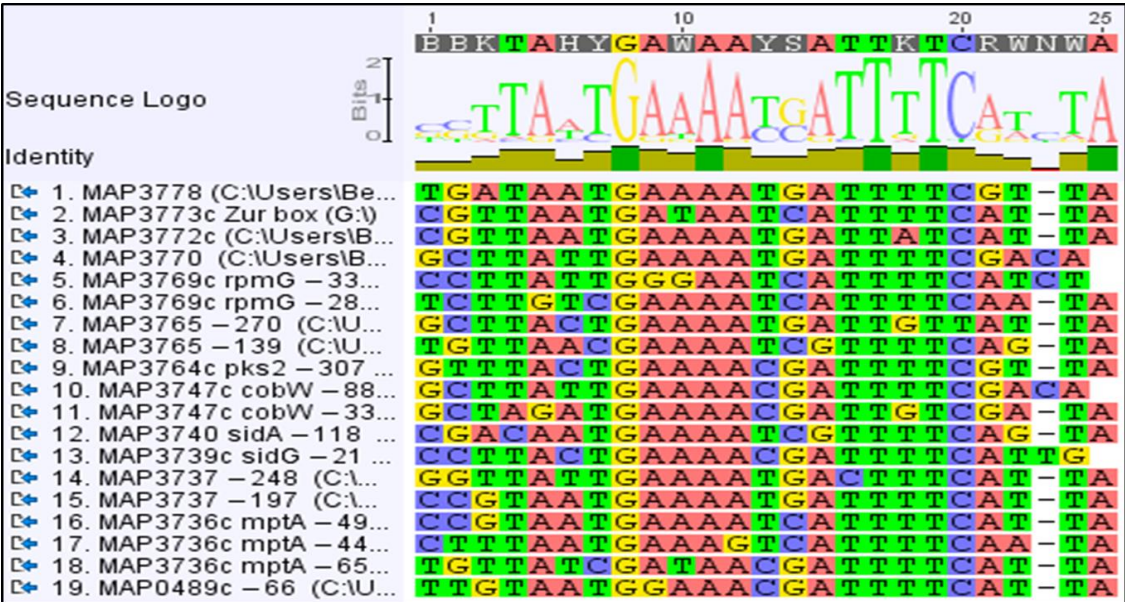


Imagen 3. Se muestran los alineamientos de los genes que pertenecen a la región promotora del regulón de zinc de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* que se realizaron en el Software *Geneious 7.1.3*.

Podemos observar la gran similitud que tienen todos los genes, lo que pudiera indicar que pueden ser regulados por la misma proteína o proteínas muy similares entre sí.

Una vez obtenidos los alineamientos, se diseñó la cadena complementaria para cada uno y se mandaron sintetizar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla 7. Sondas obtenidas de la región promotora del regulón de zinc para los experimentos de EMSA.

Gen	No.	Lote	Secuencia	TM (°C)	Conc. (pmol/µL)	Descripción
MAP3778-236	1926	030217	TGATAATGAAAATGATTTTCGTTA ACTATTACTTTTACTAAAAGCAAT	58.1	222	Secreción de tipo VII

Continúa...

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

	1927	030217		50.5	159	AAA-ATPasa EccA
MAP3773c-30	1920 1921	030217 030217	CGTTAATGATAATCATTTTCATTA GCAATTACTATTAGTAAAAGTAAT	56.8 56.8	261 233	Proteína desregulación de la absorción Fe ²⁺ /Zn ²⁺ , proteína de la familia Fur
MAP3772c-30	1928 1929	030217 030217	CGTTAATGAAAATGATTATCATT GCAATTACTTTTACTAATAGTAAT	58.1 58.1	190 174	Síntesis de cobalamina tipo cobW, chaperona de metal
MAP3770-88	1930 1931	030217 030217	GCTTATTGAAAATGATTTTCGACA CGAATAACTTTTACTAAAAGCTGT	61 61	189 212	Síntesis de cobalamina tipo cobW, chaperona de metal
MAP3770-33	1932 1933	030217 030217	TCGAGATGAAAATGATTTCCCAATA AGCTCTACTTTTACTAAGGGTTAT	62.4 62.4	237 210	Síntesis de cobalamina tipo cobW, chaperona de metal
MAP3769c-283	1934 1935	030217 030217	TCTTGTCGAAAATCATTTTCAATA AGAACAGATTTTAGTAAAAGTTAT	59.5 59.5	202 218	Proteína ribosómica 50s L33
MAP3769c-338	1936 1937	030217 030217	CCTTATTGGGAATCATTTTCATCT GGAATAACCTTAGTAAAAGTAGA	62.4 62.4	179 194	Proteína ribosómica 50s L33
MAP3765-270	1938 1939	030217 030217	GCTTACTGAAAATGATTGTTATTA CGAATGACTTTTACTAACAATAAT	59.5 59.5	240 198	Proteína de la familia PPE
MAP3765-139	1940 1941	030217 030217	TGTTAACGAAAATCGTTTTCAGTA ACAATTGCTTTTAGCAAAAAGTCAT	61 61	211 167	Proteína de la familia PPE
MAP3764c-307	1942 1943	030217 030217	GTTTACTGAAAACGATTTTCGTTA CAAATGACTTTTGCTAAAAGCAAT	61 61	183 214	Policétido sintasa
MAP3747c-88	1944 1945	030217 030217	GCTTATTGAAAACGATTTTCGACA CGAATAACTTTTGCTAAAAGCTGT	62.4 62.4	194 204	Putativa proteína de síntesis de cobalamina
MAP3747c-33	1946 1947	030217 030217	GCTAGATGAAAACGATTGTCGATA CGATCTACTTTTGCTAACAGCTAT	63.8 63.8	217 212	Putativa proteína de síntesis de cobalamina
MAP3740-118	1948 1949	030217 030217	CGACAATGAAAATCGTTTTCAGTA GCTGTTACTTTTAGCAAAAAGTCAT	62.4 62.4	192 188	Péptido sintasa no ribosomal
MAP3739c-21	2108 2109	030717 030717	CCTTACTGAAAACGATTTTCATTG GGAATGACTTTTGCTAAAAGTAAC	62.4 62.4	177 237	Transportador MFS
MAP3737-197	2110 2111	030717 030717	CCGTAATGAAAATGATTTTCATTA GGCATTACTTTTACTAAAAGTAAT	59.5 59.5	185 170	Proteína de la familia PPE
MAP3737-248	2112 2113	030717 030717	GGTTATTGAAAATGACTTTCATTA CCAATAACTTTTACTGAAAGTAAT	59.5 59.5	200 168	Proteína de la familia PPE
MAP3736c-65d	2114 2115	030717 030717	TGTTATCGATAACGATTTTCATTA ACAATAGCTATTGCTAAAAGTAAT	59.5 59.5	198 173	ABC transportador ATP-proteína de unión
MAP3736c-440d	2116 2117	030717 030717	CTTTAATGAAAGTCATTTTCAATA GAAATTACTTTCAGTAAAAGTTAT	50.1 50.1	206 167	ABC transportador ATP-proteína de unión
MAP3736c-491d	2118 2119	030717 030717	CCGTAATGAAAATCATTTTCATTA GGCATTACTTTTAGTAAAAGTAAT	59.5 59.5	177 165	ABC transportador ATP-proteína de unión
MAP0489c-66	2120 2121	030717 030717	TTGTAATGGAAACGATTTTCATTA AACATTACCTTTGCTAAAAGTAAT	58.5 58.5	197 213	Proteína transportadora de sustrato del transportador ABC

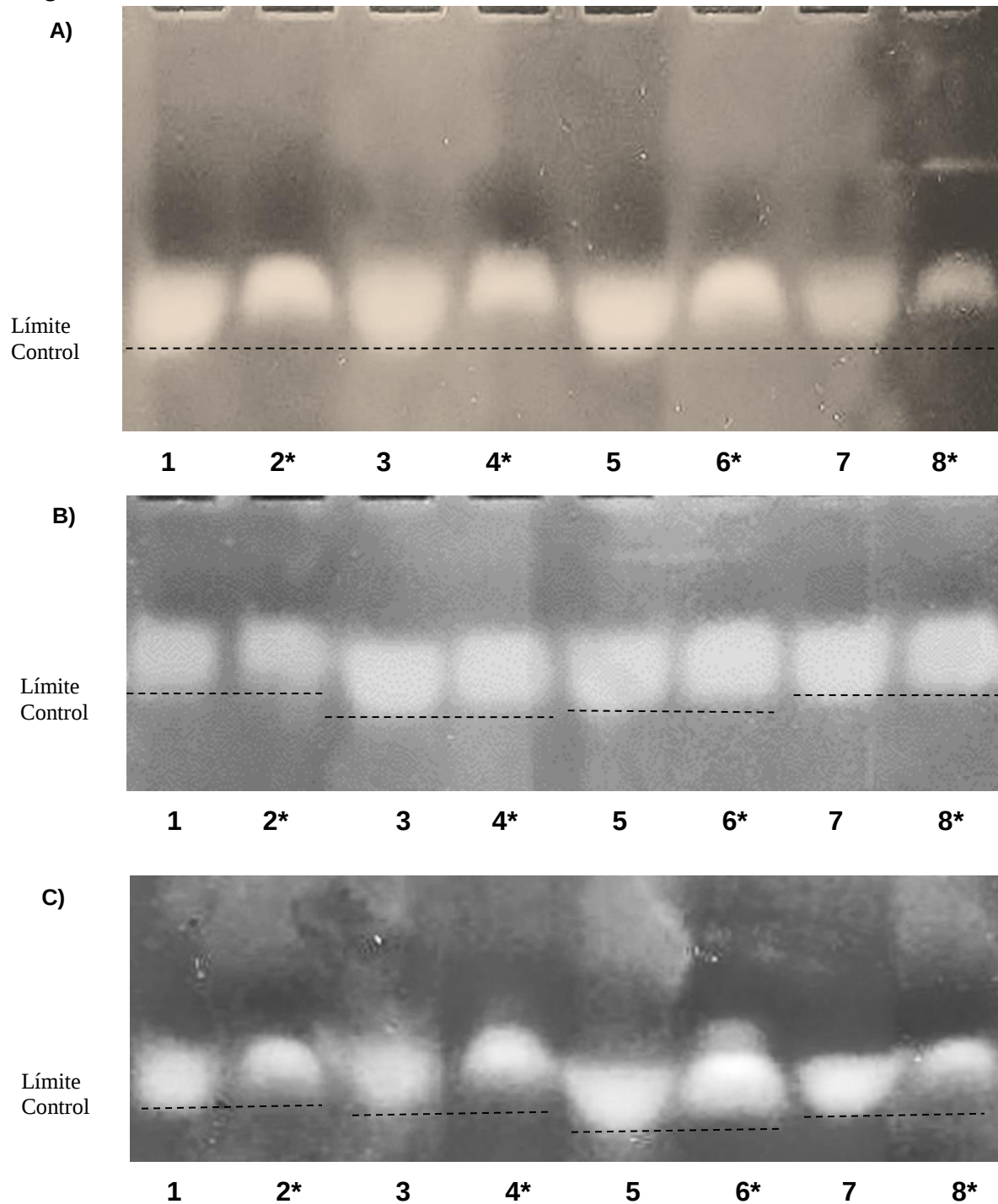
Tabla 7. En la tabla se muestra el gen, número de la sonda, lote, secuencia, temperatura óptima (°C), concentración a la que se encuentran las sondas y la descripción de función de cada una.

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

9.3. Ensayo de cambio en la corrida electroforética

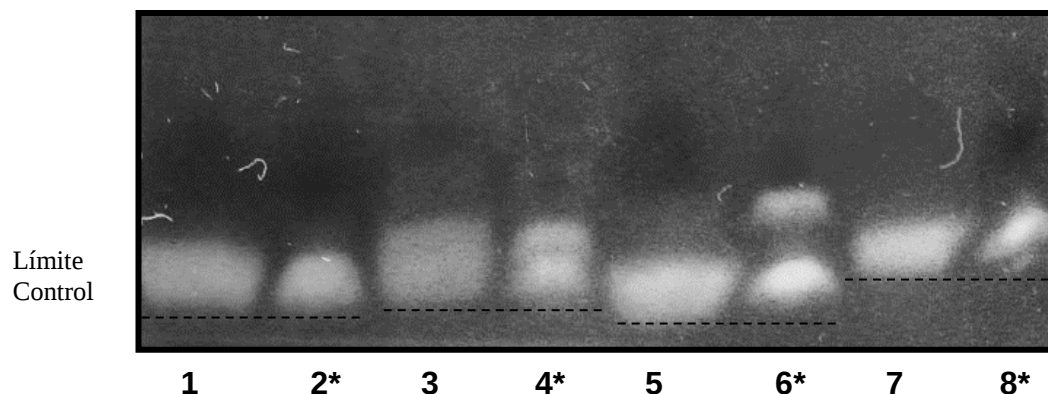
A continuación se muestran las imágenes de los resultados de los EMSA's realizados a las 20 sondas con la proteína MAP3773c.

Imagen 4 EMSA



Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

D)



E)

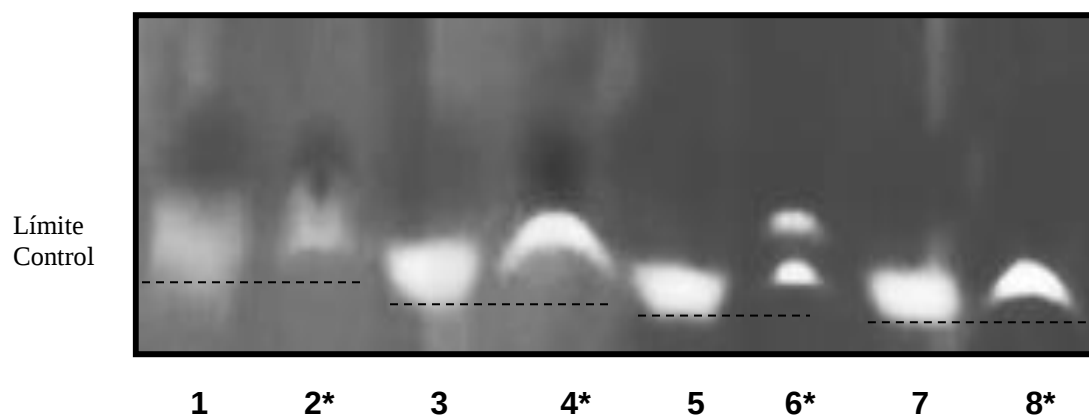


Imagen 4. A) 1 y 2 corresponden a la sonda MAP3773c; 3 y 4, MAP3778-236; 5 y 6, MAP3772c-30; 7 y 8, MAP3770-88. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se encuentra la proteína MAP3773c, por lo tanto los carriles 1, 3, 5 y 7 son utilizados como controles negativos para cada sonda. **B)** 1 y 2 corresponden a la sonda MAP3769c-283; 3 y 4, MAP3769c-338; 5 y 6, MAP3770-33; 7 y 8, MAP3765-270. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se encuentra la proteína MAP3773c, por lo tanto los carriles 1, 3, 5 y 7 son utilizados como controles negativos para cada sonda. **C)** 1 y 2 corresponden a la sonda MAP3765-139; 3 y 4, MAP3764c-307; 5 y 6, MAP3747c-88; 7 y 8, MAP3747c-33. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se encuentra la proteína MAP3773c, por lo tanto los carriles 1, 3, 5 y 7 son utilizados como controles negativos para cada sonda. **D)** 1 y 2 corresponden a la sonda MAP3740-118; 3 y 4, MAP3739c-21; 5 y 6, MAP3737-197; 7 y 8, MAP3737-248. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se encuentra la proteína MAP3773c, por lo tanto los carriles 1, 3, 5 y 7 son utilizados como controles negativos para cada sonda. **E)** 1 y 2 corresponden a la sonda MAP3736c65d; 3 y 4, MAP3736c-440d; 5 y 6, MAP3736c49d; 7 y 8, MAP0489c-66. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se encuentra la proteína MAP3773c, por lo tanto los carriles 1, 3, 5 y 7 son utilizados como controles negativos para cada sonda.

Tabla 8. Descripción de las sondas que tuvieron interacción con la proteína MAP3773c

	Descripción
MAP3778-236	Secreción de tipo VII AAA-ATPasa EccA
MAP3773c	Regulación de la absorción Fe^{2+} y Zn^{2+}
MAP3772c-30	Síntesis de cobalamina
MAP3770-88	
MAP3747c-88	
MAP3747c-33	
MAP3764c-307	Policétido sintasa
MAP3765-139	Proteína de la familia PPE
MAP3737-197	
MAP3737-248	
MAP3740-118	Péptido sintasa no ribosomal
MAP3739c-21	Transportador ABC
MAP3736c65d	Transportador ATP-proteína de unión
MAP3736-440d	
MAP3736c-491d	
MAP0489c-66	Proteína de transporte del sistema ABC

Tabla 8. Se indica la función para las sondas que tuvieron interacción con la proteína MAP3773c, mostrando en negritas las sondas en las que hubo una mayor interacción que el resto.

En la imagen 4 podemos observar que en los carriles de los genes MAP3773c, MAP3778-236, MAP3772c-30, MAP3770-88, MAP3765-139, MAP3764c-307, MAP3747c-88, MAP3747c-33, MAP3740-118, MAP3739c-21, MAP3737-197, MAP3737-248, MAP3736c65d, MAP3736-440d, MAP3736c-491d y MAP0489c-66 en presencia de la proteína MAP3773c, hubo un retardamiento del recorrido a través del gel en comparación de los carriles del mismo gen que no contenía a la proteína (indicados como controles negativos), lo que nos indica que si hubo una interacción de dichos genes con la proteína MAP3773c que nos sugiere una posible participación en la regulación de estos.

Al contrario que en los genes MAP3769c-283, MAP3769c-283, MAP3769c-338 y MAP3765-270 con la proteína MAP3773c no se observa gran diferencia en el recorrido en el gel con el control negativo, lo que indica únicamente que no hubo interacción del gen con la proteína. Para poder concluir si MAP3773c participa o

no en la regulación de estos, sería necesario realizar más estudios en condiciones diferentes como en presencia de metales para comprender si dicha regulación podría llevarse a cabo solo en condiciones especiales.

La interacción de la proteína MAP3773c con la región promotora del regulón de zinc sugiere una posible participación en la regulación de la expresión de estos genes ubicados en la isla genómica de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Como ya se mencionó, la proteína MAP3773c tuvo una interacción con el gen MAP3773c, con una posibilidad de que se regule así mismo. Las diferentes funciones de la interacción de la proteína MAP3773c con los genes de la región promotora del regulón de zinc, son secreción de tipo VII AAA-ATPasa EccA (MAP3778), regulación de la absorción $\text{Fe}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (MAP3773c), síntesis de cobalamina (MAP3772c y MAP3747c), policétido sintasa (MAP3764c), proteína de transporte del sistema ABC (MAP0489c). Los genes con los que se obtuvo una mayor interacción tienen la función de transportador MFS (MAP3739c), proteína de la familia PPE (MAP3737) y transportador ATP-proteína de unión (MAP3736c). Estos genes pertenecen al grupo que mayor expresó proteínas de transporte de metales y del sistema ABC. La ZnGI comprende LSP14 (MAP3725-3764c), un grupo intermedio con un alto número de genes para las proteínas ribosómicas (MAP3765-3770), LSP15 (MAP3771-3776c) y el MAP del grupo de genes adyacentes 3778-3788. Éste último está precedido por una caja de Zur y codifica para un sistema de secreción de tipo ESX-VII, que medía el transporte de virulencia asociada a proteínas PE y PPE. Solo un sitio se encuentra fuera de la ZnGI, (MAP0487-0489c), descrita como importador de alta afinidad a zinc (Eckelt *et. al.*, 2014).

Para comprender la importancia de la regulación de la proteína sobre todos estos genes, explicaremos su función y participación en la homeostasis de metales y virulencia.

9.3.1. Secreción de tipo VII AAA-ATPasa EccA y proteína de la familia PPE

Las micobacterias usan sistemas de secreción tipo VII (T7S) para secretar proteínas a través de su envoltura celular completa (Houben *et. al.*, 2012). Las micobacterias patógenas pueden tener hasta cinco sistemas T7S designados ESX-1 a ESX-5, al menos 3 de estos sistemas de secreción son esenciales para la virulencia y/o viabilidad micobacteriana. Estos sistemas están compuestos por genes que codifican los componentes estructurales del sistema de secreción (EccD), las proteínas de membrana conservadas (EccB y EccC) y la ATPasa AAA + (EccA), la micosina (MycP) que tiene homología con las proteasas de tipo subtilisina y dos proteínas ESX secretadas. Además, todos los sistemas ESX, excepto ESX-4, también contienen genes que codifican miembros de la familia de proteínas PE/PPE (Shah & Briken, 2016).

ESX-1 es necesario para la persistencia dentro de los macrófagos, la propagación de célula y la virulencia, está involucrado en la lisis de la membrana fagosomal de la bacteria. ESX-2 es necesario para la estabilidad de la pared celular de micobacteria y lisis de la célula huésped (Shah & Briken, 2016). ESX-3 está regulado por el represor Zur y, como tal, aumenta en condiciones de baja disponibilidad de hierro y/o baja de zinc (Houben *et. al.*, 2014). ESX-5 media la secreción de la mayoría de las proteínas PE/PPE a la superficie celular, también se requiere para reducir la secreción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos e induce una forma de muerte celular independiente de caspasa en macrófagos después del escape fagosómico de la bacteria (Shah & Briken, 2016).

Las proteínas PE/PPE están adyacentes al cluster del gen *esx* dentro de los loci *esx*, un subconjunto permaneció en la envoltura celular donde son importantes para modificar la permeabilidad celular y absorción de fuentes de carbono hidrofóbicas (Cole *et. al.*, 1998). Esta permeabilización de la membrana ocurre temprano durante la infección y permite manipular varias vías de señalización del hospedador.

Las proteínas PE/PPE son un objetivo principal de la respuesta inmune adquirida del huésped. Para ello hacen uso de chaperonas, el cual el más destacado es EspG que sirve como una partícula de reconocimiento de señal en analogía a las vías de secreción conservadas que transporta complejos de PE/PPE recién sintetizadas al sistema ESX-5, la ATPasa EccA atosólica ayuda a disociar EspG del PE/PPE (Houben *et. al.*, 2014).

Además de EspG, hay otra proteína citosólicas involucrada en la mayoría de los sistemas de secreción ESX, que es EccA. Pertenece a la familia de las proteínas AAA+ (ATPasas), cuyos miembros participan en un gran número de procesos diversos, incluida la degradación de proteínas, la transducción de señales y el ensamblaje y desensamblaje de complejos de proteínas. Este complejo acopla la hidrólisis de ATP a un cambio conformacional del complejo que se propaga al sustrato unido. Aunque no se conocen completamente el paso de desmontaje, es necesario para la secreción de tipo VII (Houben *et. al.*, 2014).

Imagen 5 Modelo para la secreción tipo VII.

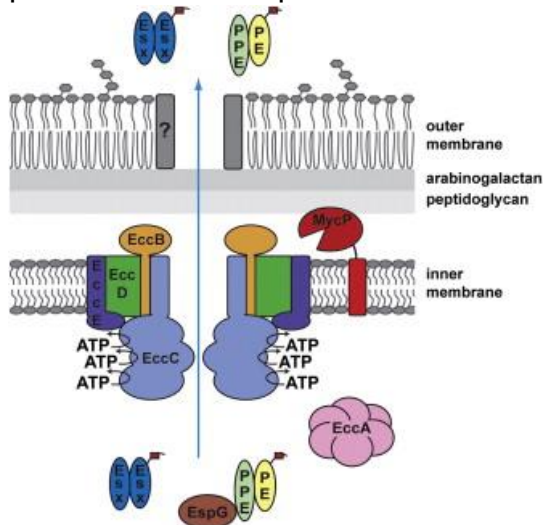


Imagen 5. Edith N. G. "Take five- Type VII secretion systems of *Mycobacteria*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular. Volume 1843. Issue 8. Pages 1707-1716. August 2014.

Tanto la proteína ESX como la PE/PPE se exportan como dímeros mediante el sistema de secreción. El componente citosólico EspG reconoce específicamente

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

las proteínas PE/PPE y posiblemente dirige estos sustratos al canal de membrana putativo.

Imagen 6 Modelo hipotético para la secreción tipo VII con la proteína MAP3773c.

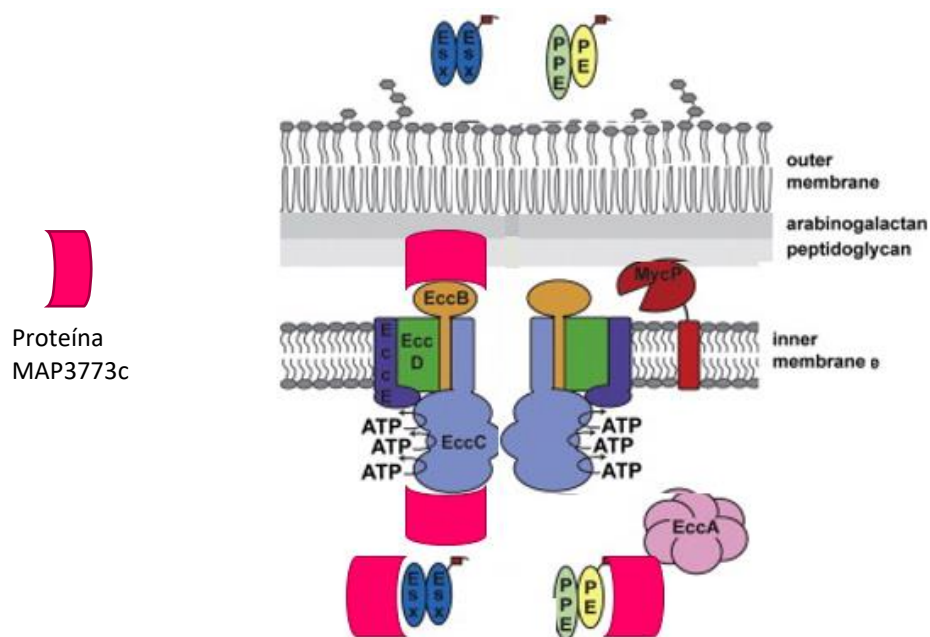


Imagen 6. Edith N. G. "Take five- Type VII secretion systems of *Mycobacteria*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular. Volume 1843, Issue 8, Pages 1707-1716, August 2014.
Modelo hipotético para la secreción tipo VII con la proteína MAP3773c.

En el modelo hipotético en donde proponemos que la proteína MAP3773c al regular genes que tienen esta función, está regulando el transporte de sustratos a través de los canales de membrana externa para contrarrestar los mecanismos de defensa del huésped y logrando sobrevivir en el interior del macrófago.

9.3.2. Regulación de la absorción Fe^{2+} y Zn^{2+}

La homeostasis del zinc está estrechamente regulada por el regulador de la familia FUR (Zur) en muchas bacterias, ya que la inanición de zinc, así como el exceso de zinc, conducen a la muerte celular. A pesar de esto, se sabe poco sobre la homeostasis del zinc en las micobacterias (Eckertl *et. al.*, 2014).

9.3.3. Síntesis de cobalamina

En la síntesis del ADN, la cobalamina tiene un papel central siendo el cofactor de una doble vía metabólica (Tarazona *et. al.*, 2016). El hecho de que genes que codifican enzimas para la síntesis de cobalamina se encuentren regulados por la proteína MAP3773c podría tener como consecuencia directa una alteración en la biosíntesis, transporte, replicación, recombinación y reparación celular.

9.3.4. Policétido sintasa y péptido sintasa no ribosomal

La biosíntesis de ácidos grasos es el primer paso en la formación de lípidos de membrana, y representa un aspecto esencial del metabolismo en todos los organismos. Los péptidos no ribosomales y policétidos son un grupo diverso de productos naturales con estructuras químicas complejas y enormes, se sintetizan en complejos de enzimas péptidos sintetasa no ribosomal (NRPS) y policétido sintasa (PKS) (Wang *et. al.*, 2014).

Las PKS se clasifican actualmente en tres tipos. Las PKS de tipo I son enzimas multidominio grandes que utilizan una estrategia modular, y cada módulo está compuesto por dominios catalíticos responsables del reconocimiento, activación y condensación de acil-CoA. Los sitios catalíticos de PKS tipo II y tipo III están organizados en proteínas separadas. Los NRPS se definen generalmente como enzimas multidominio modulares. La disposición de los módulos dentro de las enzimas NRPS y PKS tipo I a menudo determina el número y el orden de los constituyentes monoméricos del producto, a pesar de las desviaciones en la iteración del módulo y la omisión. Se ha identificado un número creciente de agrupaciones de genes que codifican tanto NRPS como PKS tipo I para la biosíntesis de productos naturales complejos y puede reflejar en parte la distribución sesgada de genomas secuenciados hacia patógenos y cepas ambientalmente importantes (Wang *et. al.*, 2014).

Dada la relevancia de este sistema en el metabolismo lipídico y en la biosíntesis de moléculas estructurales esenciales de la pared celular, cualquier

alteración del mismo tendría consecuencias directas sobre la biosíntesis de la pared celular y el metabolismo lipídico de las micobacterias, procesos que podría estar siendo regulado por la proteína MAP3773c para el adecuado crecimiento bacteriano.

9.3.5. Transportador ABC, proteína de transporte del sistema ABC y transportador ATP-proteína de unión

Proteínas en su mayoría especializadas en el transporte activo de sustancias a través de la membrana celular. Actúan como transportadores activos primarios o bombas exportadoras. Los transportadores ABC son proteínas transmembrana que utilizan la energía de hidrólisis de la adenosin trifosfato (ATP) para llevar a cabo ciertos procesos biológicos incluyendo la translocación de varios sustratos a través de membranas y procesos no relacionados con el transporte unidireccional, tales como la traducción de ARN y reparación de ADN (Nuñez *et. al.*, 2016).

Imagen 7 Transporte ABC.

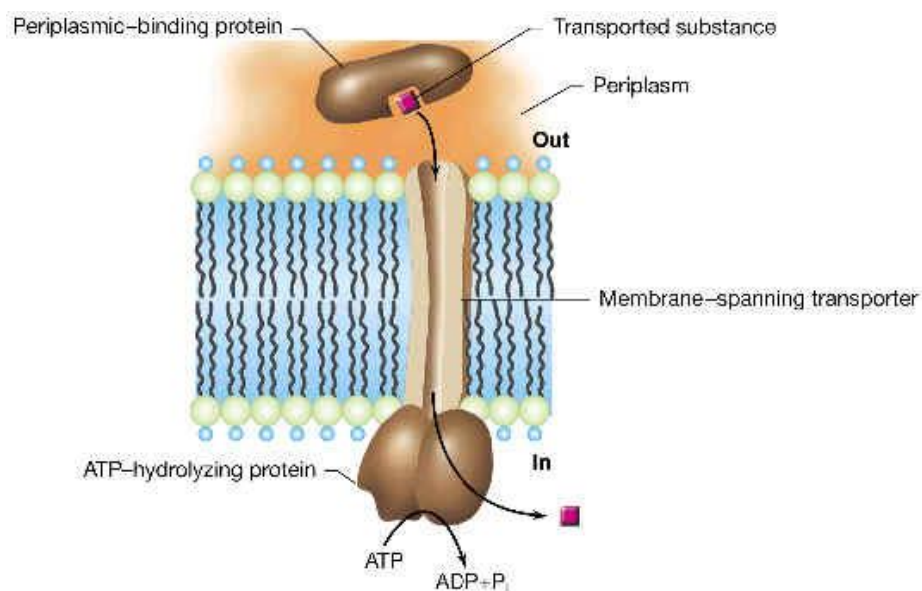


Imagen 7. Los transportadores ABC son proteínas transmembrana que utilizan la energía de hidrólisis ATP para llevar a cabo ciertos procesos biológicos incluyendo la translocación de varios sustratos a través de membranas y procesos no relacionados con el transporte unidireccional, tales como la traducción de ARN y reparación de ADN.

Imagen 8 Modelo hipotético para transporte ABC con la proteína MAP3773c.

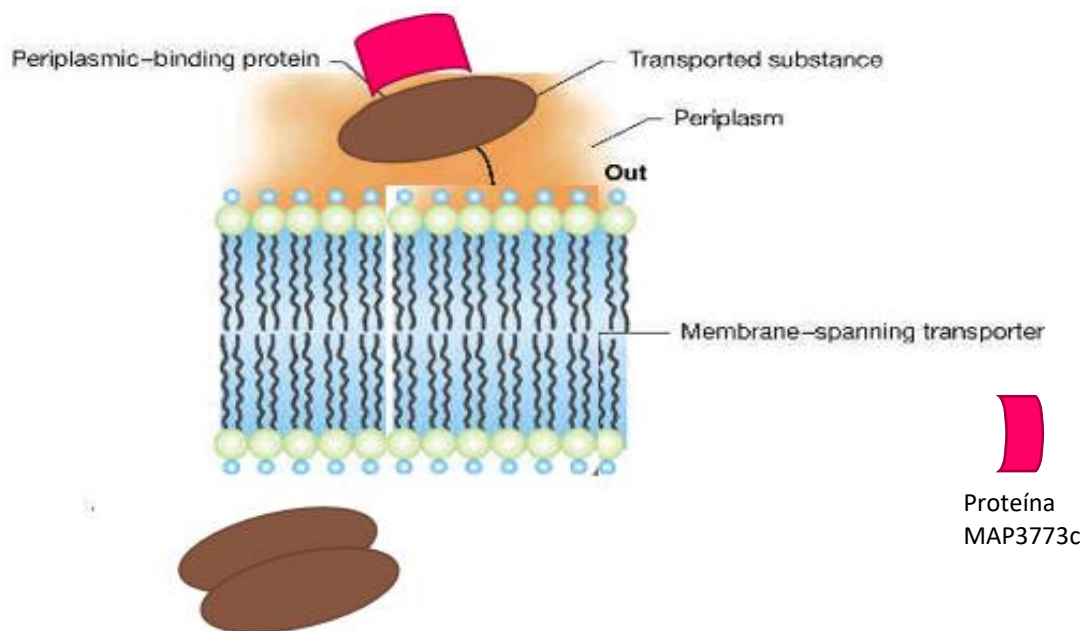


Imagen 8. Modelo hipotético en donde observamos la posible regulación de la proteína MAP3773c en el transporte tipo ABC.

En el modelo hipotético que proponemos, la proteína MAP3773c al regular genes que codifican para transportadores ABC, juega un papel esencial en la protección de los organismos frente a metabolitos tóxicos ya que regulan el intercambio de carbohidratos, lípidos, aminoácidos, iones metálicos, péptido y proteínas a través de la membrana plasmática.

9.3.5.1. MAP3734c-3736c

MAP3734c-3736c y MAP3737 se designan como genes hipotéticos, sin embargo, las búsquedas de dominios determinaron que MAP3734c-3736c forman un heterodímero y formarán un sistema de transporte de múltiples fármacos de tipo ABC y MAP3737 tiene un dominio PPE que se asemeja a los dominios de unión al sustrato de los sistemas de captación de sideróforos, como la proteína de unión al ATP (Lamont *et. al.*, 2013).

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

Imagen 9 MAP regula una nueva vía de hierro, para la asimilación de hierro en respuesta a la expresión de la síntesis de óxido nítrico del huésped.

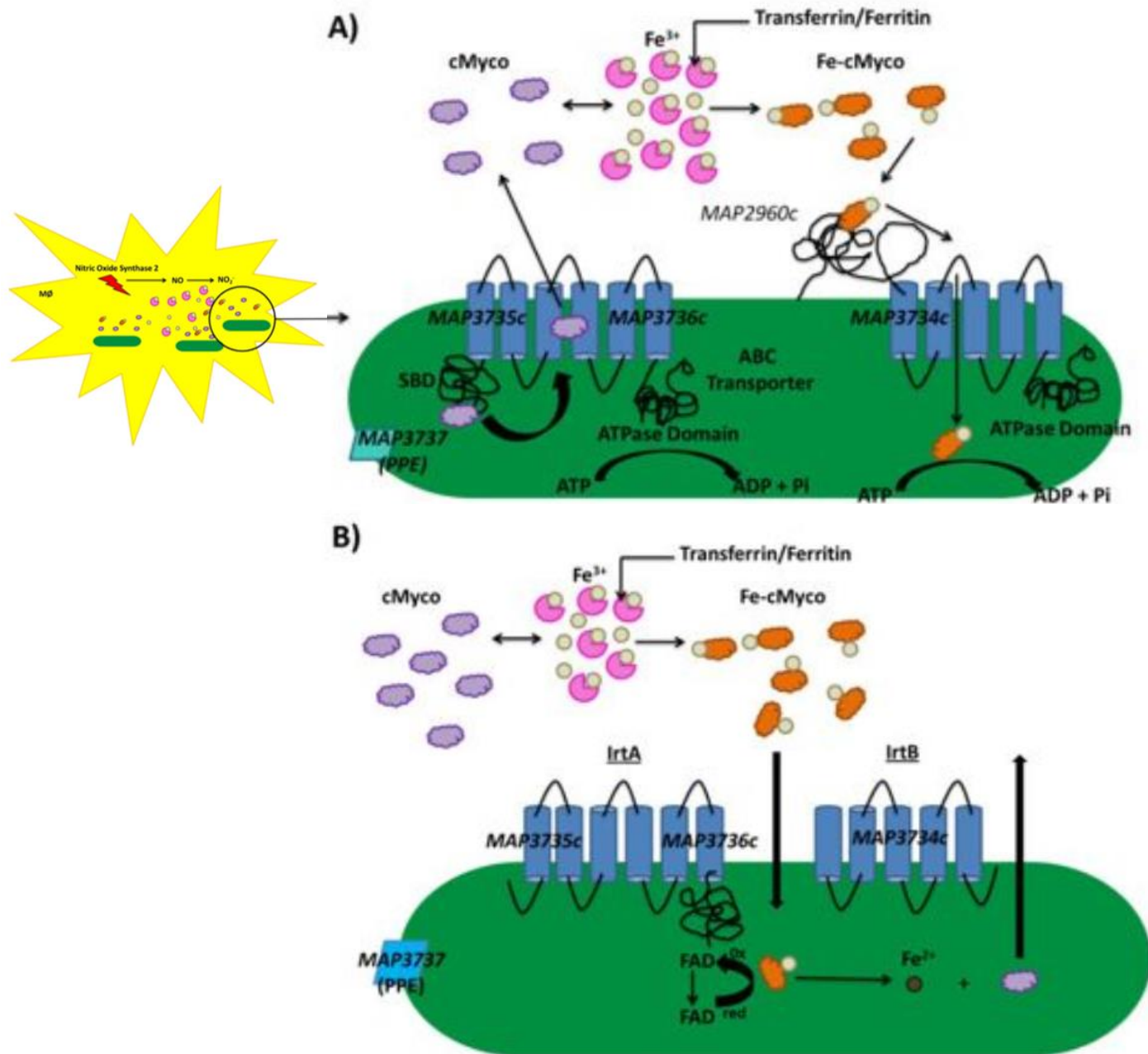
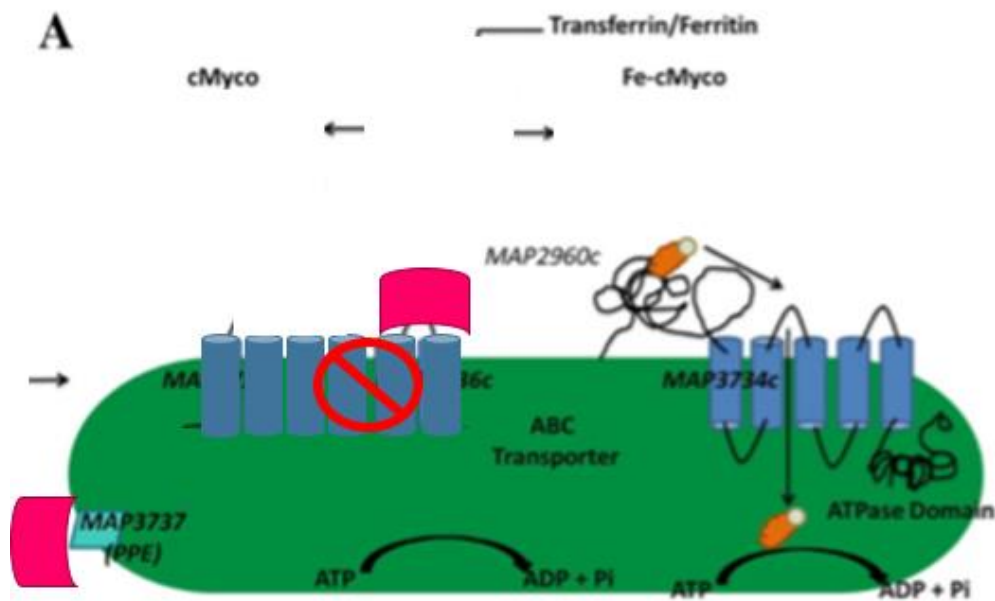


Imagen 9 MAP3734c-3736c forma una vía de regulación del hierro y es el equivalente de irtAB en *M. tuberculosis*. **A)** IrtA (MAP3735c y MAP3736c) se une y libera carboximicobactina (cMyco) no ferrada en la célula huésped. cMyco se une al hierro (Fe-cMyco) y se transporta de nuevo a MAP a través de MAP2960c (no identificado en interactome) e IrtB (MAP3734c). MAP3737, una proteína PPE, puede servir como una molécula de transducción de señales y detectar la acumulación de NO. La regulación al alza de esta ruta está vinculada a la expresión NOS-2 por el host. La figura está basada en parte por Farhana et al. **B)** MAP3734c-3736c forma un homodímero y transporta Fe-cMyco dentro de la célula MAP. Una vez que Fe-cMyco está dentro, el dominio de unión a FAD de IrtA (MAP3735c y MAP3736c) se activa y se une a la flavina, que acepta electrones de NAD (P) H. Esto permite que la flavina reductasa funcione como una reductasa de hierro. Reducción de Fe³⁺ al Fe²⁺ se disocia el hierro de la carboximicobactina por lo que puede ser utilizado por MAP.

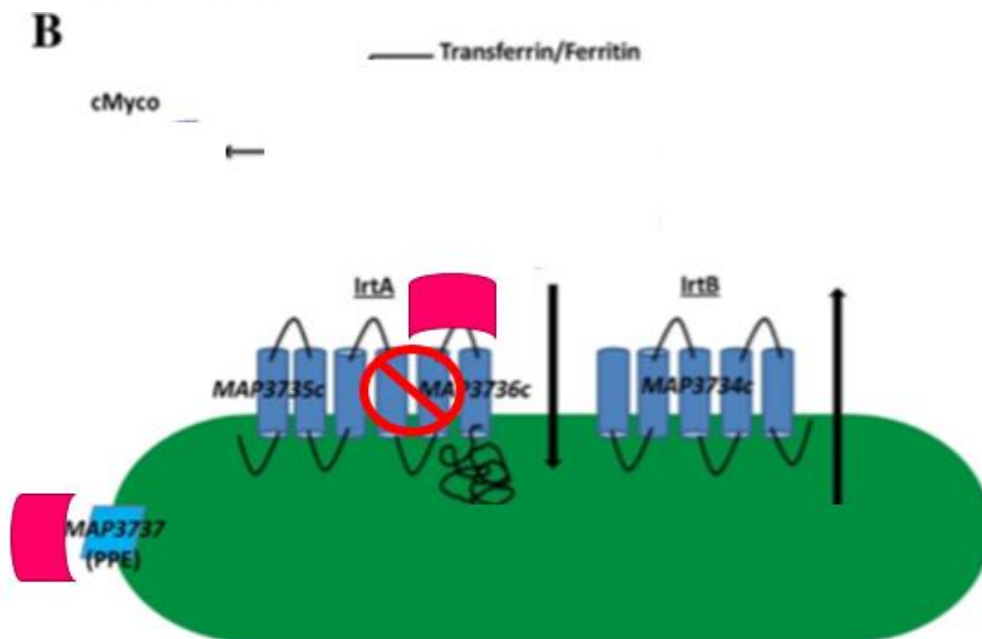
Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

Los autores sugieren que el modelo de Farhana puede ser solo reflejo de *M. smegmatis* y tiene una traducción limitada a *M. tuberculosis* y proponen que la ruta de asimilación de hierro correcta para MAP es probablemente el modelo de Ryndak et al (Lamont et. al., 2013).

Imagen 10 Modelo hipotético en donde la proteína MAP3773c regula una nueva vía de hierro, para la asimilación de hierro en respuesta a la expresión de la síntesis de óxido nítrico del huésped.



Farhana et al.



Ryndak et al.

Imagen 10. Modelo hipotético en donde la proteína MAP3773c regula una nueva vía de hierro, para la asimilación de hierro en respuesta a la expresión de la síntesis de óxido nítrico del

La proteína MAP3773c regula el gen MAP3736c, que al actuar como un complejo con MAP3735c, indirectamente también lo regula. La expresión de estos genes se encuentra regulada en la etapa de infección inicial, donde múltiples genes se emplean para el establecimiento de patógenos. Lo que sugiere que la proteína MAP3773c este regulando dicha expresión para lograr infectar al huésped y/o contrarrestar la respuesta inmune y la inanición de metales provocado por el huésped, limitando el intercambio de metales y proteínas a través de la membrana celular. Sería necesario realizar experimentos de la proteína con MAP3735c y MAP3737 para comprender mejor este sistema y descubrir si la proteína regula los otros genes y en que situaciones lo hace.

10. CONCLUSIONES

MAP3773c es una proteína funcional que tiene capacidad de interactuar con los genes MAP3778-236, MAP3773c, MAP3772c-30, MAP3770-88, MAP3747c-88, MAP3747c-33, MAP3764c-307, MAP3765-139, MAP3737-197, MAP3737-248, MAP3740-118, MAP3739c-21, MAP3736c65d, MAP3736-440d y MAP3736c-491d de la región promotora del regulón de zinc ubicados en la Isla de patogenicidad sensible al zinc en MAP y un último gen MAP0489c-66 ubicado fuera de la isla de patogenicidad pero que cuenta con una región promotora del regulón de zinc. Todos éstos genes están implicados en distintas funciones como síntesis de cobalamina, expresión de proteínas con función de policétido sintasa, lo que aporta resistencia a la pared celular de la bacteria, así como síntesis de proteínas de la familia PE/PPE, transportadores ABC y homeostasis de metales que están implicados en la virulencia y patogenicidad de MAP, ya que regulan el tránsito de moléculas hacia el interior y exterior de la célula. Así como posiblemente puede autorregular su propia transcripción al tener interacción con el gen MAP3773c.

11. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Doctora María Fillat (Universidad de Zaragoza, España), al Dr. Gutierrez-Pabello (Universidad Nacional Autónoma de México).

Al Fondo de Investigación Sectorial que apoyó a la Dra. Landeros Sánchez para las subvenciones de este proyecto para la educación y CONACYT (2016-2018) durante la realización de este proyecto.



12. REFERENCIAS

- Anda Fernandez, P. (2005). *España Patente n° 200501481*.
- Ayele, W., Bartos, M., Svastova, P., & Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.*, 209-217.
- Bang, D., Herlin, T., Stegger, M., Bengaard, A., Torkko, P., Tortoli, E., & Thomsen, V. (2008). *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in a immunocompromised child. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2398-2402.
- Bassey, E., & Collins, M. (1997). Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected cattle. *Infect. Immun.*, 4869-4872.
- Beard, S. J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1997). Zinc (II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Molecular microbiology*, 184:231-235.
- Ben Salah, I., Cayrou, C., Raoult, D., & Drancourt, M. (2009). *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium boucherdurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2803-2808.
- Brocklehurst, K., Hobman, J., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S., Brown, N., & Morby, A. (1999). ZntR is a Zn (II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 31: 893-902.
- Campoy Sánchez, S. (2002). Importancia de los metoreguladores FUR y ZUR en la virulencia de *Salmonella typhimurium*. *Universidad Autónoma de Barcelona. Departament de Genética y Microbiología*.
- Chávez, G. (1998). Control de la paratuberculosis en caprinos y en ovinos. *Comité de enfermedades infecciosas de los ovinos y caprinos. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Departamento de Patología. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UNAM*.
- Chávez, G. (2010). Plan estratégico para el programa para la atención de la paratuberculosis en ganado, bovino, ovino y caprino en México. . *Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Unidad de posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM*.
- Chiodini, R., Van-Kruiningen, H., Thayer, W., Merkal, R., & Coutu, J. (Dig Dis Sci 1984). Possible role of *Mycobacterium* in inflammatory bowel disease: I An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. 29 (12): 1073-9.
- Chiodini, R. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. . *Vet. Clin. North Am.*, 313-339.
- Cirone, K., Morsella, C., Romano, M., & Paolicchi, F. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. *Revista Argentina de Microbiología*, 57-68.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., & Harris, D. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-380.
- Coussens, P. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.*, 3089-3096.
- Eckelt, E., Jarek, M., Frömke, C., Meens, J., & Goethe, R. (2014). Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *BMC Genomics*, V. 15 (1): 1076.
- Fillat, M. (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Elsevier. Arch Biochem Biophys*, 546:41-52.
- Forteza Ormaechea, J. I., Gisbert, J. P., & Marín-Jiménez, I. (2009). Role of *Mycobacterium avium* *paratuberculosis* in the etiopathogenesis of Crohn's disease. *Gastroenterología y Hepatología*, Vol. 32 Núm. 5.
- Gaballa, A., & Helmann, J. (1998). Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 180: 5815-5821.
- Grant, I. (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis*: the current position. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (6): 1282-93.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M., & Neill, S. (1996). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 631-636.

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

- Grass, G., Fan, B., Rosen, B., Franke, S., Nies, D., & Rensing, C. (2001). ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183: 4664-4667.
- Gutierrez Duprat, X. (2005). *Detección de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en caprinos de la región metropolitana*. Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias.
- Hantke, K. (2001). Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals*, 239-249.
- Houben, E., Bestebroer, J., Umels, R., Wilson, L., Piersma, S., Jimenez, C., . . . Bitter, W. (2012 August). Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Molecular Microbiology*.
- Houben, E., Korotkov, K., & Bitter, W. (2014 August). Take five-Type VII secretion systems of *Mycobacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1707-1716.
- Huang, D., Tang, D., Liao, Q., Chen, Q., He, Y., Feng, J., . . . Tang, J. (2008). The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic acids research*.
- Ibarra Molina, G. (2016). Caracterización bioquímica parcial y funcional de la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Universidad Autónoma de Baja California. Tesis para obtener grado de maestría*.
- Lamont, E., Xu, W., & Sreevatsan, S. (2013). Host-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* interactome reveals a novel iron assimilation mechanism linked to nitric oxide stress during early infection. *BMC Genomics*, 14:694.
- Lepper, A., Wilks, C., Kotiw, M., & Whitehead, J. (1989). Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust. Vet. J.*, 50-55.
- Li, L., Bennant, J., Zhang, Q., Amosin, A., May, B., Alt, D., . . . Kapur, V. (Aug, 2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 12344-9.
- Li, Y., Miltner, E., Wu, M., Petrofsky, M., & Bermudez, L. (2005). A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell Microbiol*, 7:539-548.
- Marcelo Míguez, S. M. (2008). Política económica y sector agropecuario. *Infovet*, 11-14.
- Martínez Covarrubias, A. G., Santillán Flores, M. A., Guzmán Ruiz, C. C., Favila Humara, L., Córdova López, D., Díaz Aparicio, E., . . . Blanco Ochoa, M. Á. (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Rev Mex Cienc Pecu*, 1-18.
- Mendez-Alvarez, S. (s.f.). La PCR múltiple en microbiología clínica. En *Laboratorio de Biología Molecular* (pág. Capítulo 10). Santa Cruz de Tenerife, España.
- Mondino, S. (2014). Regulación de la síntesis de ácidos grasos en micobacterias. *Facultad de ciencias bioquímicas y farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina*.
- Munkelt, D., Grass, G., & Nies, D. (2004). The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FirF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *Journal of bacteriology*, 186:8036-8043.
- Murcia, M., Tortoli, E., Menéndez, M., Palenque, E., & García, M. (sep, 2006). *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J. Syst Evol Microbiol*, 2049-54.
- MV Gilardoni, & Dra. SL, M. (2008). Paratuberculosis Bovina. *Infovet*, 11-14.
- Negroni. (2009). *Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana S.A.
- Núñez Carbajal, R., & Pereire Domínguez, C. (2016). Transportadores ABC y su relación con la resistencia a fármacos. *Biología Celular. Universidad de Oviedo (UniOvi)*.
- Ortiz, M., Acosta, A., Acosta, G., & Zumarraga, M. (s.f.). *Primer informe de aislamiento de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en el Perú*. Perú.
- Patzner, S., & Hantke, K. (2000). The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 275:24321-24332.
- Pfiffer, G., & Palicova, F. (2007). *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. En *Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology* (págs. 543-572). Washington, DC: P.R. Murray, E.J. Baron, J. H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller.

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

- Ratledge, C. (1982). The biology of the Mycobacteria. London.
- Retamal M., P., Beltrán M., C., Abalos P., P., Quera P., R., & Hermoso R., M. (jun 2011). Possible association between *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection and Crohn's disease. *Revista Médica de Chile*, vol. 139 no. 6: 794-801.
- Retamal, P., Beltran, C., Avalos, P., Quera, R., & Hermoso, M. (2011). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis. *Rev Med Chile*, 139:794-801.
- Rindi, L., & Garzelli, C. (January 2014). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. En *Infection, Genetics and Evolution* (págs. vol. 21; 375-383). Italy: Elsevier.
- Rivera, J. (Julio, 2015). Paratuberculosis caprina: Una revisión con especial énfasis en su interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis. *Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia*.
- Rovid Spickler, A. (2010). *Emerging and Exotic Diseases of Animals*. Iowa State University, The Center for food security & public health.
- SAG. (s.f.). *Paratuberculosis bovina (Enfermedad de Johne)*. Gobierno de Chile, SAG Ministerio de Agricultura.
- SAGARPA. (2014). SENASICA. Obtenido de Normas Oficiales Mexicanas en Materia de Salud Animal: <http://www.senasica.gob.mx/?id=787>
- Salgado A., M., & Collins, M. (2013). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en purines. Buenas Prácticas Ganaderas para reducir la carga de patógenos en predios lecheros. Informativo No. 121 Cap. 5. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. Ministerio de Agricultura, Chile.
- Sánchez Govea, J. J. (2012). Diagnóstico de la paratuberculosis ovina en los rebaños del municipio de Villa de Ramos, San Luis Potosí. *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*.
- Sanderson, J., Moss, M., Tizard, M., & Hermon-Taylor, J. (1992). PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's Disease tissue DNA extracts. *3th International Colloquium on Paratuberculosis. Florida, USA*.
- Santos, María., & Gobernado, Miguel. (s.f.). Complejo *Mycobacterium avium*: Aspectos microbiológicos. *Control Calidad SEIMC*. Servicio de Microbiología, Hospital La Fe, Valencia.
- Saunders, B., & Cooper, A. (2000). Restraining mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.*, 78: 334-341.
- Sepúlveda, S., Beltrán, C., Peralta, A., Rivas, P., Rojas, N., & Figueroa, C. (Rev Med Chile 2008). Inflammatory bowel diseases: and immunological approach. 367-75.
- Shah, S., & Briken, V. (2016 May). Modular organization of the EXS-5 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Department of Cell Biology and Molecular Genetics. University of Maryland. College Park*.
- Sigurdardóttir, Ó., Press, C., & Evensen, O. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* thorough the distal small intestinal mucosa in goats: An ultrastructural study. *Vet. Pathol.*, 184-189.
- Silver, S., Irsra, T., & Laddaga, R. (1989 New York). Bacterial resistance to toxic heavy metals. 121-139.
- Smole, S., Aleese, F., Ngampasutadol, J., & Robert, D. (2002). Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of hsp65. *J. Clin. Microbiol.*, 3374-3380.
- Sreevatsan, S. (2017). Characterization of a novel iron regulation system of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *University of Minnesota. College of Veterinary Medicine*.
- Stratmann, J., Strommenger, B., Goethe, R., Dohmann, K., Gerlach, G., Stevenson, K., . . . Kapur, V. (2004). A 38-Kilobase pathogenicity island specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Encodes cell surface proteins expressed in the Host. *Infection and Immunity*, 7 (3): 1265-74.
- Tarazona, D., Galarza, M., Levano, K., & Guio, H. (2016). Análisis genómico comparativo de cepas peruanas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 33 (2):256-63.
- Thorel, M., Krichevsky, M., & Lévy-Frébault, V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp *avium* subsp nov., *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* subsp nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silva*. *Int J Syst Bacteriol.*, 254-60.
- Tiwari, A., Vanleeuwen, J., McKenna, S., Keefe, G., & Barkema, H. (2006). Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet.*, 874-882.
- Tortoli, E., Rindi, L., García, M., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., . . . Scarparo, C. (2004). Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimera* sp. nov. *Int. J. Syst, Evol, Microbiol.*, 1277-1285.

Análisis funcional de la proteína recombinante MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el regulón de zinc en MAP.

- Uberos, J. (2013). Moléculas de la pared celular de *M. tuberculosis* y su papel en el desarrollo de nuevas vacunas. *Instituto Balmis de Vacunas*.
- Valentin-Weigand, P., & Goethe, R. (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes infect.*, 1:1121-1127.
- Van Soolingen, D., Bauer, J., Ritacco, V., Leao, S., Pavlik, I., Vincent, V., . . . Garcia, M. (1998). IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.*, 3051-3054.
- Viale, M., Zumárraga, M., Araújo, F., Zarraga, A., Cataldi, A., Romano, M., & Bigi, F. (2016). La genómica de las micobacterias. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 35 (1): 215-227.
- Victoria-Gasteiz. (2007 Junio). Caracterización molecular, detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.
- Viljanen, M., Olkkonen, L., & Katila, M. (1993). Conventional identification characteristics, mycolate and fatty acid composition, and clinical significance of MAIX AccuProbe-positive isolates of *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 31, 1376-1378.
- Wang, H., Fewer, D., Holm, L., Rouhiainen, L., & Sivonen, K. (2014 May). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Division of Microbiology and Biotechnology. Department of Food and Environmental Sciences and Institute of Biotechnology and Department of Biosciences. Viikki Biocenter. University of Helsinki*.
- Wang, J., Pritchard, J., Kreitmann, L., Montpetit, A., & Behr, A. (2014). Disruption of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific genes impairs in vivo fitness. *BMC Genomics*, 15:415.