



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTA DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA

"Determinación de la expresión de MAP3773c recombinante de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por inducción con Hierro, Zinc y Hierro + Zinc"

TÉSIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. BERTHA LANDEROS SÁNCHEZ

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. LILIA ANGÉLICA HURTADO AYALA

PRESENTA

ALEXES EDUARDO GONZÁLEZ CORNEJO

TIJUANA B.C. 2018

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 029

Tijuana, B. C., a 16 de agosto de 2018

C. Alexes Eduardo González Cornejo
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

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

Es propuesto, por la Dra. Bertha Landeros Sánchez y la Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala quienes serán las responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema "Determinación de la expresión de MAP3773c recombinante de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por inducción con Hierro, Zinc y Hierro + Zinc", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII. ANEXOS

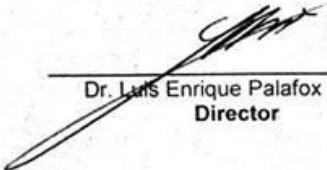




Dra. Bertha Landeros Sánchez
Directora de Tesis



Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Co- Directora de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

RESUMEN

La paratuberculosis o "enfermedad de Johne" es una enteritis granulomatosa crónica causado por el denominado "bacilo de Johne" que fue descrito en 1895 por Johne y Frothingham como una forma modificada o derivada de *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium avium* el cual fue clasificado taxonómicamente como tubérculo *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*; por su poca comodidad al nombrarlo, fue clasificado como *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* como agente etiológico^[42]. Este padecimiento se caracteriza por presentar diarrea crónica, pérdida involuntaria de peso, escualidez severa, granulomas en rumiantes y animales de ganado dado que no hay un tratamiento que cure la paratuberculosis, lo que compromete de manera importante al sector agropecuario con importantes pérdidas en producción y económicas^[43]. La regulación transcripcional de genes que biosintetizan sideróforos en bacterias son regulados principalmente por reguladores transcripcionales de la familia Ferric Uptake Regulator (Fur o FurA) para el caso de hierro, Zinc uptake regulator (Zur o FurB) para el caso de zinc o Manganese uptake regulator (Mur) para el caso de manganeso ^[52]. Una vez que la disponibilidad de Fe^{+2} supera los límites citoplasmáticos en procariotas, proteínas de la familia Fur utilizan Fe^{+2} como cofactor y represor de genes que sintetizan sideróforos dado que estos agentes quelantes para introducir Fe^{+3} reduciéndolo a Fe^{+2} vía reacción Fenton fundamentada por el ciclo Haber-Weiss (Fig.4). El presente estudio se enfoca en la expresión de un regulador transcripcional denominado MAP3773c en presencia de Fe^{+2} , Zn^{+2} y Fe^{+2} - Zn^{+2} en conjunto a diferentes concentraciones mediante electroforesis SDS page 12% en gel de poliacrilamida.

AGRADECIMIENTOS.

...Agradezco principalmente a la Doctora Bertha Landeros Sánchez por haberme aceptado en su línea de investigación, demostrar paciencia, compromiso y apoyo con todas las herramientas para mi formación como investigador, en conjunto con el laboratorio de biología molecular y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

... A mis padres por haberme apoyado durante todo el lapso de mi estudios

... A mi tutora académica la Dra. Lilia Angelica Hurtado por motivarme a llevar a cabo un proyecto de investigación

CONTENIDO

I. INTRODUCCION.....	6
I.1. Género <i>mycobacterium</i>	
I.2. Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	
I.3. <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> (MAP)	
I.4. <i>Paratuberculosis</i>	
I.5. Reguladores transcripcionales de la familia FUR (<i>Ferric uptake regulator</i>)	
II. JUSTIFICACIÓN.....	23
III. HIPÓTESIS.....	23
IV. OBJETIVO GENERAL.....	24
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
VI.1. Transformación de cepa <i>E. coli</i> BL-21 con el plásmido pRSET-MAP3773c y sobreexpresión de MAP3773c.	
VI.2. Cultivo celular e inducción de la expresión de MAP3773c	
VI.2.1 Cultivo celular	
VI.2.2. Lisis celular	
VI.2.3. Determinación de la expresión de MAP3773c	mediante
electroforesis por SDS page 12%	
VI.2.3.1. Gel separador	
VI.2.3.2. Gel concentrador	
VI.2.3.3. Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12%	
VII. RESULTADOS.....	31
VII.1. Fig. 6 Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12% para el tratamiento de <i>E. coli</i> BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c con ZnSO ₄	
VII.2. Fig. 7 Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12% para el tratamiento de <i>E. coli</i> BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c con FeNTA	
VII.3. Fig. 8 Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12% para el tratamiento de <i>E. coli</i> BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c con Zn-FeNTA	
VIII. DISCUSIÓN.....	34
IX. CONCLUSIÓN.....	36
X. REFERENCIAS.....	36

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Género *Mycobacterium*

El descubrimiento de la primer micobacteria y su denominación se le atribuye a Robert Koch en 1882 al identificar a *Mycobacterium tuberculosis* dando paso al comienzo de la micobacteriología como una rama de la ciencia encargada de estudiar a las micobacterias ^[1]. Esta clasificación taxonómica comienza a desarrollarse a partir de 1886 cuando Lehmann y Neumann descubren a *Mycobacterium avium* y, *Mycobacterium avium* como causantes de tuberculosis en aves y ganado ^[1]. El género *Mycobacterium* se compone de alrededor de 150 especies ^[2]. Anteriormente, el género se dividía en dos amplios grupos: micobacterias no tuberculosas y micobacterias tuberculosas, de las cuales alrededor de 25 especies son patógenas para los humanos y se ha reconocido que tienen la capacidad de ser saprófitas y oportunistas en su patogénesis. Posteriormente por la identificación de una amplia colección de especies que formarían parte del género *Mycobacterium*, se clasificaron en bacterias de crecimiento lento, de crecimiento rápido, producción de pigmento en presencia o ausencia de luz y por sus características coloniales por Timpre y Runyon en 1950 ^[3]. Las micobacterias son aerobias, inmóviles, no esporulados y ácido alcohol resistentes, característica aprovechable para su tinción y caracterización microbiológica. Son bacilos Gram positivos de una longitud que oscila entre los 1 - 10 μ m, tienen una pared celular de tipo IV y su contenido de guanina y citosina es de 62 y 70 mol % ^[4].

La clasificación de Runyon es un sistema introducido en 1959 por Ernest Runyon para identificación micobacteriana basado en la pigmentación y condiciones de crecimiento de

las bacterias dentro del género *Mycobacterium*. La clasificación de micobacterias no tuberculosas (bacterias diferentes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*), se divide en cuatro grupos:

- **Grupo I (Fotocromógenos):** Producción de colonias no pigmentadas cuando son sembradas en ausencia de luz y colonias pigmentadas después de la exposición de luz y reincubación.
- **Grupo II (Escotocromógenos):** Producción de colonias amarillas o naranjas en presencia o ausencia de luz
- **Grupo III y IV (No cromógenos y de crecimiento rápido):** Colonias no pigmentadas en presencia o ausencia de luz, o la presencia de coloración tenue después de la exposición a luz.

A diferencia del grupo IV, los demás grupos tienen un tiempo de duplicación en medio sólido mayor a 7 días y los del grupo IV son menor a 7 días los cuales serán denominados micobacterias de crecimiento lento y micobacterias de crecimiento rápido respectivamente. En Fig.1 se presentan algunas micobacterias de acuerdo a su clasificación de Runyon.

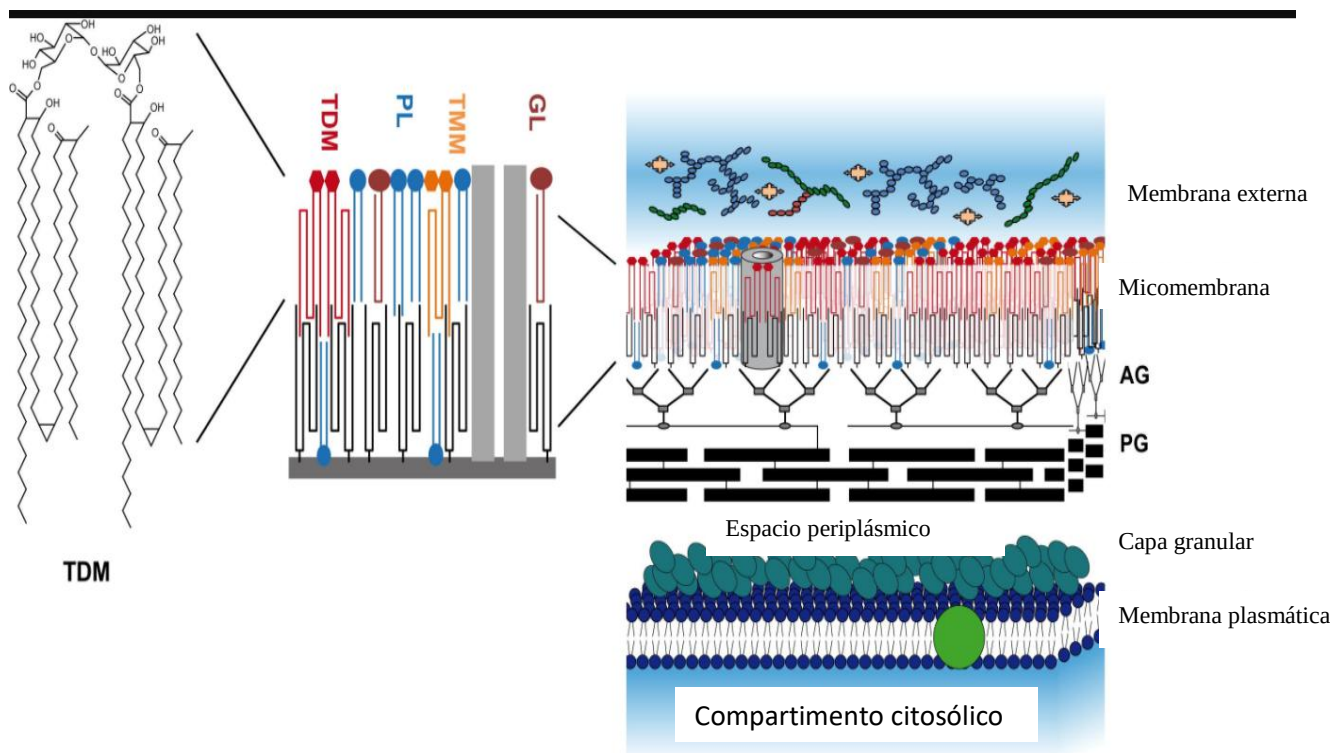
Fig. 1 Clasificación de Runyon de las micobacterias atípicas de interés dermatológico ^[5].

<i>Especie</i>	<i>Grupo de Runyon</i>
<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>	I
<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. goodii</i>	II
<i>M. avium-intracellulare</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. ulcerans</i>	III
<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	IV

Actualmente los tradicionales criterios de Runyon para micobacterias no tuberculosas, está perdiendo relevancia debido a los avances en la micobacteriología por técnicas de cultivo mucho más rápidas, pruebas de DNA y técnicas de cromatografía ^[6]. El género *Mycobacterium* tiene la capacidad de sintetizar ácidos micólicos, los cuales forman parte de la pared celular y es lo que hace al género tan único, debido a que sintetiza largas cadenas de entre 60 y 90 átomos de carbono dándole la capacidad de ser acido-alcohol resistente, razón por la que se omite la tinción de Gram por la de Ziehl-Neelsen^[7]. *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias son biológicamente similares a las bacterias Gram positivas (aunque frente a la tinción de Gram, las micobacterias son débilmente Gram positivas o no se tiñen), pero tienen aspectos distintos^[3]. Los componentes de la pared celular de micobacterias son únicas en términos de su contribución en patogénesis del género *Mycobacterium*, haciéndolos altamente antigénicos y volviéndose parásitos intracelulares en macrófagos^[8].

La pared celular micobacteriana está principalmente compuesta por ácidos micólicos, cadenas largas 2-alquil, 3-hidroxi de ácidos grasos, estructuras que son un sello distintivo de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* y especies del género *Mycobacterium* relacionados^[9]. Pueden encontrarse sin unir, extraíbles con solventes orgánicos como ésteres de trealosa o glicerol, ó esterificando unidades pentaarbinofuranosil terminales de arabinogalactano, polisacárido que junto con el peptidoglicano, forman el insoluble esqueleto de la pared celular^[10] como se muestra en (Fig. 2).

Fig2. Modelo de la pared celular micobacteriana ^[10]



La membrana externa está principalmente compuesta por glucano y proteínas, con una pequeña cantidad de lípidos. La micomembrana corresponde a la barrera de permeabilidad. El folleto interno está formado por un conjunto paralelo de cadenas de ácido micólico (color negro) ligado arabinogalactano (AG) el cual también se encuentra unido covalentemente al peptidoglicano (PG); Éste folleto también está compuesto presumiblemente de lípidos libres que incluyen al factor cuerda trehalosa 6,6-dimicolato (DMT) coloreado en rojo, monomicolato de trehalosa (TMM) coloreado en naranja, varias glicoproteínas (GL) coloreado en café, y fosfolípidos (PL) coloreado en azul. Adaptado de Zuber *et al.* 2008^[11]. Una representación de TDM muestra una cadena larga de ácidos micólicos que se empaquetan después de plegarse en la micomembrana (Unidades micólicas, ciclopropano y grupos cetónicos) para encajar en una membrana convencional de 7 - 8 nm de grosor. La membrana granular encima de la membrana plasmática se compone de proteínas; estas proteínas posiblemente participan en los tratamientos previos de la bacteria al observarse en microscopía electrónica de transmisión proyectando una apariencia más gruesa que el folleto externo de la membrana plasmática^[10].

La extraordinaria eficiencia de la pared celular micobacteriana como barrera de permeabilidad, Minnikin en 1982 originalmente propuso un modelo en el que los ácidos micólicos están covalentemente unidos al co-polímero de peptidoglicano-arabinogalactano y forman un folleto interno de una bicapa asimétrica^[12]. La baja permeabilidad de la pared celular micobacteriana se le contribuye como causa de las micobacterias a ser resistentes a agentes antibioticoterapéuticos y quimioterapéuticos; Existe evidencia de que la naturaleza de los ácidos micólicos presentes en la pared celular micobacteriana juegan un papel esencial en determinar la fluidez y permeabilidad de la pared celular micobacteriana ^[13]. Mutantes y tratamientos que afectan la biosíntesis de ácido micólico y producción de lípidos extraíbles demuestran un incremento en la permeabilidad de la pared celular micobacteriana y un decremento drástico de la virulencia, recalcando la importancia de la integridad de la pared celular micobacteriana para la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis* ^[14].

El transporte de carbohidratos al interior de la micobacteria como fuente de carbono ha sido reconocida dado que la envoltura de este género tiene un número determinado de canales y sistemas de transporte de carbohidratos de diferente tamaño molecular dependiendo de la especie. *Mycobacterium smegmatis* tiene 28 transportadores de carbohidratos propios como sistema de absorción^[15]. La mayoría de los sistemas de transporte de azúcares (19/28) en *Mycobacterium smegmantis* pertenecen a la familia de transportador dependiente de unión de ATP (ABC); *M. smegmantis* posee un facilitador propio de glicerol de familia de proteínas intrínsecas mayores (MFS) de las cuales una se asigna a transportador de glucosa, y una permeasa de galactosa de la superfamilia de solutos de sodio (SSS) al igual que sistemas de transporte intermembranales de polioles,

pentosas y hexosas son predecidas; Esta predicción bioinformática fue probada recientemente tras el descubrimiento de una permease de glucosa denominada GlcP de *M. smegmatis*^[16]. Tras la sobreexpresión de GlcP en una mutante glucosa-negativa de *E. coli* se logró demostrar que la colonia tenía la capacidad de fermentar glucosa con la finalidad de incrementar absorción de glucosa^[17].

Por el hecho de que la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos es uno de los primeros efectos del medicamento antituberculoso más eficiente como es la isoniazida^[18], existe gran interés a descifrar la química y la biosíntesis de los ácidos micólicos; Esta vía metabólica representa una valiosa fuente para identificar blancos potenciales para el desarrollo de nuevos antibióticos dado el alarmante contexto emergente de la multirresistencia medicamentosa, resistencia medicamentosa extrema y la resistencia medicamentosa total por tuberculosis^[10].

I.2. Complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

Inicialmente MAC consistía de dos especies: *M. avium*, y *M. intracellulare*, y son las micobacterias no tuberculosas (MNT) más comunes asociadas a patologías humanas. Debido a la dificultad de diferenciar ambas especies de una, colectivamente también pueden ser referidas como *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI). MAC está compuesto por 28 serotipos (1-28), de los cuales los primeros tres pertenecen a *M. avium*, y el resto a *M. intracellulare*^[19]. Tras las publicaciones de Thorel, et al en 1990 durante la caracterización y definición de *M. avium*, dada por análisis molecular, como la hibridación DNA-DNA, con base a las características de crecimiento y pruebas bioquímicas se incorporaron tres subespecies a MAC: *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *avium*^[20,21,22]. Bacterias que conforman MAC

pertenecen al grupo III del criterio de Runyon ya que son no cromógenos de crecimiento lento. Estos organismos son bacilos Gramm positivos y pueden ser aislados a partir de fuentes acuosas frescas o salinas, el mayor aprovechamiento es aislado en aguas con salinidad moderada (≤ 2 g% NaCl) y tienen la capacidad soportar condiciones de pH relativamente bajas entre 4.6 y 6.8, mantienen una longitud en tamaño de entre .7 y 3.3 nm (suficientemente pequeños para invadir espacios alveolares después de inhalación^[23]).

A mediados del siglo XX, se comenzó a detectar una diseminación de infecciones por micobacterias tuberculosas y no tuberculosas en pacientes inmunocomprometidos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). MAC causan formas diseminadas en 25 a 50% de los pacientes adultos infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), sin haber recibido un tratamiento antirretroviral previo y dado que el factor principal de riesgo son signos clínicos de células CD4 menor a $50/\text{mm}^3$ ^[24] ^[25], de hecho hasta antes de la introducción de este tipo de tratamientos, causaba alrededor de 20,000 casos al año en Estados Unidos de Norteamérica volviéndose una preocupación epidemiológica^[25]. Antígenos de MAC tienen la capacidad de aumentar la producción viral de VIH-1 en pacientes infectados ^[26].

Otra de las preocupaciones a nivel internacional, incluyendo países desarrollados es la infección recurrente a animales de ganado, principalmente rumiantes, por la característica de algunas micobacterias de MAC de evadir el sistema inmunológico o retardarlo en su transcurso patológico, invadiendo principalmente a los macrófagos del huésped como por ejemplo *M. avium* subs. *paratuberculosis* (MAP). Es reconocido que MAC tiene la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, como anteriormente se mencionó su tolerancia a niveles de pH relativamente bajos y por el hecho de obtener nutrientes de

fuentes de carbono aun cuando existen tratamientos de cloro u ozono en aguas potables^[27]. Esta forma de adaptación y cambios en la pared celular por ambientes extremos puede ser ligado a su resistencia a antibióticos y más aun cuando MAC tiene homología al perfil génico del huésped para llevar a cabo su replicación^[28].

I.3. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

La micobacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) pertenece a MAC y al grupo III del criterio de Runyon, y es un bacilo recto Gram positivo, aerobio, acido-alcohol resistente, tiene un tiempo de generación de 20 horas y crece en condiciones térmicas de 37°C, su tamaño oscila entre .7 - 2.0 um. Históricamente la identificación de MAP no ha sido rigurosa y se ha basado solo en determinar a la micobacteria como un microorganismo de crecimiento lento, acido-alcohol resistente y dependiente de micobactina, un sideróforo micobacteriano utilizado para quelar y secuestrar el hierro disponible en el huésped, específicamente en el macrófago^[29,30]. MAP es una bacteria de crecimiento lento Gram positiva y se cultiva agar yema de huevo de Herrold en presencia de micobactina, dado que no se ha logrado promover la síntesis de micobactina a partir de MAP^[31, 32]. MAP es un parásito intracelular que utiliza hierro para su crecimiento y su fisiología a partir de la micobactina^[33] y sintetiza genes de regulación férrica dentro de macrófagos en un huésped, esto para competir contra la inmunidad del huésped y mantener en homeostasis la disponibilidad de hierro, expresando genes como *bfr A* o factores transcripcionales como IdeR que funciona como un monitor global en la regulación de hierro en *M. tuberculosis* durante la invasión intracelular^[34, 35].

MAP es el principal agente etiológico de la paratuberculosis o enfermedad de Johne en rumiantes y animales del ganado ^[32,36,37]. La clona común K-10 fue aislada en 2005 para la secuencia completa del genoma de MAP^[32] lo cual ha tenido un impacto importante en la identificación de sitios genómicos como blanco para un tratamiento y elaboración de reactivos para identificar a la bacteria durante su aislamiento. Se logró secuenciar un genoma de un cromosoma circular de 4,829,781 pares de bases que codifica para 4,350 Marcos Abiertos de Lectura (ORF), 45 tRNAs y un operón rRNA, y posteriormente un dominio EntE de salicil-AMP ligasa (MbtA), siendo el primer gen en un clúster de genes de biosíntesis de micobactina y dando respuesta a que MAP es dependiente de micobactina para su crecimiento y fisiología ^[32].

Micobactina es un sideróforo que utilizan las micobacterias para obtener hierro férrico (Fe^{+3}) o hierro ferroso (Fe^{+2}) del huésped. Genes que codifican para la biosíntesis de micobactina son promovidos por la presencia de hierro extracelular con el objetivo de mantener una homeostasia de disponibilidad de hierro ^[38]. El hierro es esencial para la fisiología, metabolismo, transporte de nutrientes y acción enzimática de bacterias, (ver Tabla 1) tanto que se ha observado en micobacteriología que algunas especies como *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *M. avium subs. hominissuis* o *M. avium subsp. paratuberculosis* han evolucionado y diseñado nuevas vías alternas y exclusivas de cada bacteria para la captación de hierro en situación de estrés o privación de hierro cuando un tratamiento antimicrobiano está presente o con la finalidad de contrarrestar y competir contra el sistema inmunológico del huésped ^[39]. Se han reconocido anteriormente que micobactina presenta diferentes estereoisómeros o cadenas laterales R en la estructura de micobactina con el objetivo de que funcionen como exoquelinas en el espacio intersticial

implementando solubilidad y polaridad diferente para la captación de hierro presente en moléculas complejas; Se han identificado 20 moléculas diferentes en MAC y 3 en MAP^[38].

Tabla 1. Rol de hierro en bacterias ^[40]

Área afectada	Efecto
Composición celular	Deficiencia de hierro puede causar: inhibición de crecimiento, decremento en síntesis de RNA y DNA, inhibición de esporulación, cambios en morfología celular.
Metabolismo intermedio	Procesos metabólicos que requieren hierro: ciclo de ácido tricarboxílico, fosforilación oxidativa, fijación de nitrógeno, biosíntesis de moléculas aromáticas.
Productos metabólicos	Los siguientes productos son algunos de los que regulan incremento o decremento por hierro: Porphirinas, toxinas, vitaminas, antibióticos, hidroxamátos, citocromos, pigmentos, sideróforos, compuestos aromáticos, DNA y RNA.
Proteínas y enzimas que requieren hierro	Peroxidasa, superóxido dismutasa, nitrogenasa, hidrogenasa, glutamato sintasa. Citocromos, ferredoxinas, flavoproteínas, ferritina.

El mecanismo de captación y liberación de hierro por sideróforos se lleva a cabo por procesos exclusivos de las micobacterias debido a su composición en la membrana y pared celular por su alto contenido de lípidos hace más compleja la situación de solubilizar el hierro como lo hacen comúnmente otras bacterias como *E. coli* o *K. pneumoniae*. El mecanismo de micobacterias para la captación de hierro radica en la producción de exoquelinas, agentes quelantes que solubilizan el hierro como derivados de ácido salicílico o pentapéptidos derivados de micobactina que reducen Fe^{+3} a Fe^{+2} ya sea extracelular para atravesar una barrera lipídica gruesa y que la reacción ocurra en la membrana celular o intracelular^[40,41]

I.4. Paratuberculosis

La paratuberculosis o "enfermedad de Johne" es una enteritis granulomatosa crónica causado por el denominado "bacilo de Johne" que fue descrito en 1895 por Johne y Frothingham como una forma modificada o derivada de *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium avium* el cual fue clasificado taxonómicamente como tubérculo *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*; por su poca comodidad al nombrarlo, fue clasificado como *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* como agente etiológico^[42]. Este padecimiento se caracteriza por presentar diarrea crónica, pérdida involuntaria de peso, escualidez severa, granulomas en rumiantes y animales de ganado dado que no hay un tratamiento que cure la paratuberculosis, lo que compromete de manera importante al sector agropecuario con importantes pérdidas en producción y económicas^[43]. La importancia clínica radica en que este padecimiento cursa asintomático y sin signos macroscópicos que pueden ser no específicos, sutiles o ausentes. El diagnóstico no invasivo como la toma de muestra fecal puede tomar hasta 1 año o más en resultar positivo a una infección por MAP a diferencia de una valoración invasiva en los nódulos linfáticos o en el intestino delgado mediante un corte histológico o biopsia. Los pocos signos clínicos detectables en animales se dividen en cuatro fases:

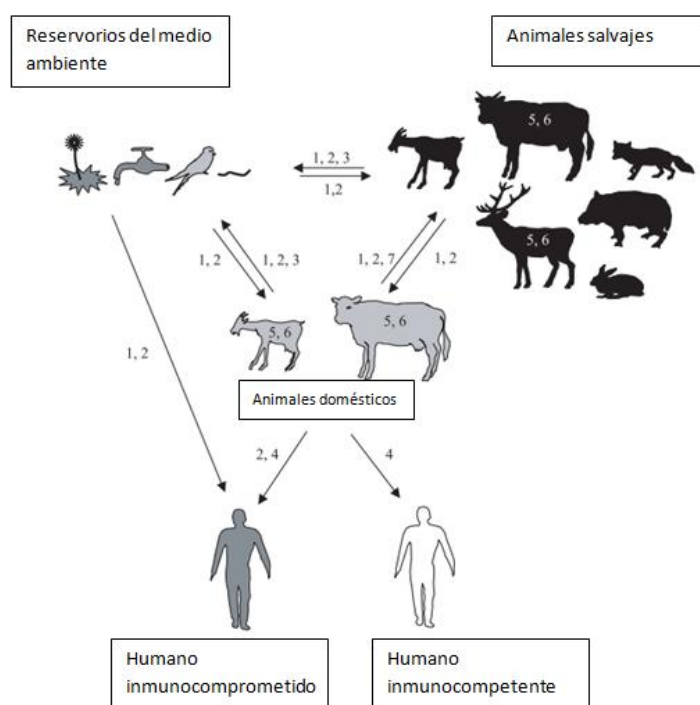
- (I) Fase silente: Esta fase por lo general afecta al ganado de hasta 2 años de edad y no hay signos clínicos de infección, no hay efectos subclínicos y no puede detectarse por métodos costo-eficientes. Para detectar esta etapa debe hacerse por estudios en microgranulomas, reconocer que hubo una administración de MAP en el huésped cortes histológicos, necropsia, cultivo fecal (aprovechable en caso de pre-inmunización) y detección de interferón gamma (IFN- γ), aunque es posible

encontrar falsos positivos dado que MAP presenta antígenos similares a *Mycobacterium* spp. ambiental. Pueden progresar rápidamente a la etapa III o hasta IV conllevando a la muerte y debe separarse del ganado para prevenir infección en animales sanos^[44,45].

- (II) Fase subclínica: Aún en esta etapa los signos clínicos están ausentes en animales infectados pero ya pueden utilizarse métodos de detección costo-eficientes como el cultivo microbiológico a partir de muestras fecales, lesiones intestinales, fluidos con contenido microbiológico como contenido intestinal por dilución. Algunos animales pueden presentar anticuerpos y detectarse pero durante esta etapa la toma de muestra fecal ocurre antes de una respuesta inmunológica como la presencia de anticuerpos^[45].
- (III) Fase clínica: Signos clínicos se presentan por lo regular durante una incubación de 2 o hasta 10 años dependiendo del nivel de exposición y la capacidad del huésped y su perfil inmunológico. En esta fase el huésped presenta lipoatrofia, atrofia muscular, diarrea persistente, incremento en apetito, sed, decremento en producción de leche. Signos vitales, respiratorios y temperatura corporal permanecen normales^[45].
- (IV) Fase clínica avanzada de infección: Es una etapa fulminante en la que se presentan signos letárgicos, debilidad y demacración. El huésped presenta edema inter-mandibular, hipoproteinemia, anemia, diarrea líquida y crónica. En esta etapa los animales domésticos son sacrificados por falta de tratamiento antibacteriano contra MAP^[45].

MAP puede mantenerse en reservorios por varios años incluyendo fuera del huésped en el ambiente como en plantas, agua potable o en materia fecal y distribuirse de forma pasiva o indirecta en diferentes tipos de huéspedes como se presenta en **Fig. 3**.

Fig. 3 Rutas de infección y transmisión de MAC. Ilustración de posibles rutas de transmisión de MAC entre el medio ambiente, animales domésticos y seres humanos^[28].



1: Infección oral; 2: Infección por aerosoles; 3: Infección pasiva; 4: Infección por productos derivados; 5: Transmisión vertical; 6: Transmisión horizontal; 7: Infección por depredación^[28].

MAP mantiene una supervivencia en el huésped como un parásito intracelular que compete por nutrientes como hierro o zinc interviniendo en el sistema inmunológico del huésped. De las principales formas que compete es mediante la inhibición parcial de proteínas como la ferroportina 1 (FPN-1), una proteína transmembranal en macrófagos que se encarga de sustraer hierro desde el citoplasma hacia el espacio intersticial, lo que resulta

práctico para MAP inhibir FPN1 dado que pasa gran parte de la infección en el huésped dentro de macrófagos ^[46]. Durante la etapa III de infección por MAP, MAP tiene la capacidad inhibir parcialmente la expresión de IFN- γ y la acción de linfocitos B frente a MAP posterior a una presentación antigénica por el complejo mayor humano de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en una respuesta de tipo celular^[47,48].

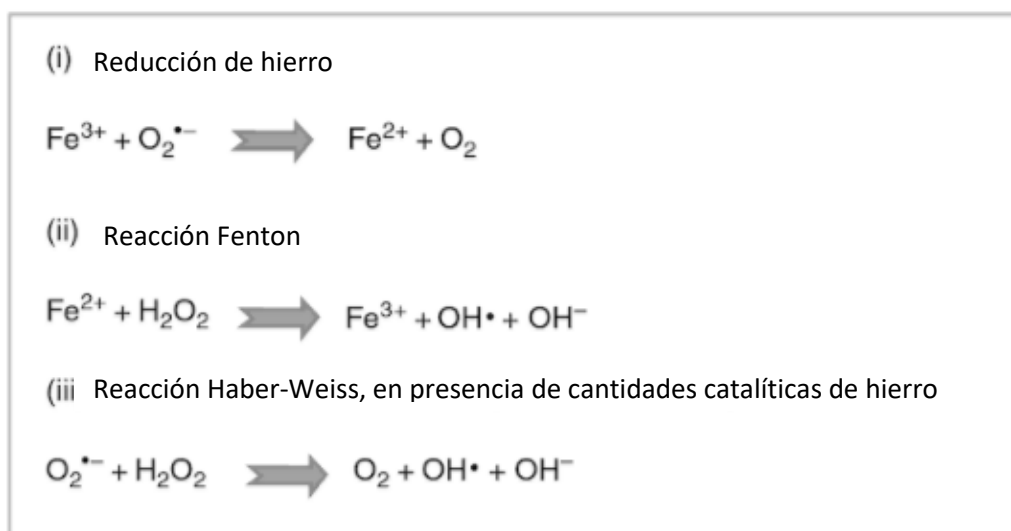
La prevalencia de la paratuberculosis en animales de ganado con decremento en producción de derivados de animales infectados con MAP, representa una pérdida económica con un impacto importante en el mercado y sector agropecuario. En EE.UU. la paratuberculosis representa pérdidas de más de \$200 millones de dólares estadounidenses en un mercado de lácteos con valor de \$369 billones de dólares estadounidenses exclusivamente en ese país^[49,50]. En México aún no ha sido estudiado con exactitud el impacto económico en el mercado pero se estima que hay una incidencia de que el 30% del ganado en México se encuentra comprometido frente a la paratuberculosis^[51].

I.5. Reguladores transcripcionales de la familia FUR (*Ferric uptake regulator*)

La importancia de Fe⁺² como cofactor en diversas reacciones bioquímicas vitales para la supervivencia de procariotas y demás seres vivos ha sido reconocida ^[40]. Por ello es que existe la competencia de este metal transicional, así como Zn⁺² o Mn⁺² mediante la regulación transcripcional para la síntesis de agentes quelantes o sideróforos como micobactina. La regulación transcripcional de genes que biosintetizan sideróforos en bacterias son regulados principalmente por reguladores transcripcionales de la familia Ferric Uptake Regulator (Fur o FurA) para el caso de hierro, Zinc uptake regulator (Zur o

FurB) para el caso de zinc o Manganese uptake regulator (Mur) para el caso de manganeso [52]. Una vez que la disponibilidad de Fe^{+2} supera los límites citoplasmáticos en procariotas, proteínas de la familia Fur utilizan Fe^{+2} como cofactor y represor de genes que sintetizan sideróforos dado que estos agentes quelantes para introducir Fe^{+3} reduciendolo a Fe^{+2} via reacción Fenton fundamentada por el ciclo Haber-Weiss (Fig.4). Tal reacción genera radicales libres como ($-\text{OH}$) proveniente del peróxido de hidrógeno; reactivos que oxidan DNA, RNA y moléculas vitales para las bacterias, por lo que proteínas tipo Fur limitan la síntesis de sideróforos cuando se supere el umbral de metales de transición en el citoplasma [53].

Fig. 4 Ilustración esquemática del ciclo Haber-Weiss [54]



El ciclo Haber-Weiss ocurre en tres fases. (i) Reducción de un metal de transición, (ii) Reacción Fenton, y (iii) Reacción Haber -Weiss [54]

En un caso contrario, cuando la disponibilidad de Fe^{+2} es escaso en MAP, existen secuencias de DNA que contienen reservas de Fe^{+2} denominadas "cajas de hierro" donde se adhiere el Fe^{+2} por proteínas FUR. Cuando existe una escases la RNA polimerasa accede a promotores cognitivos, y los genes para la biosíntesis de sideróforos y otras funciones

relacionadas a la captación del hierro son expresadas^[55]. Estas cajas de hierro fueron secuenciadas y determinadas en *E. coli* a partir de una región promotora palindrómica de 19 pb 5' GATAATGATAATCATTATC 3' que se alinea a 30 promotores controlados por hierro y es una secuencia donde se adhiere una proteína de entre 17 y 19 kD, Fur^[56]

Independientemente de la homeostasis de metales transicionales durante la invasión del huespes, las proteínas de la familia FUR tienen funciones biológicas diferentes (Fig.5). Las proteínas FUR tienen la capacidad de expresar genes frente al estrés oxidativo en presencia de radicales libres como el peróxido de hidrógeno detectado por una proteína tipo FUR denominada peroxide-stress response (PerR), o el óxido nítrico dado que pueden dañar la secuencia de DNA y RNA simultaneamente. No se conoce con exactitud el mecanismo preciso de FUR como sistema de reconocimiento de ambientes de estrés oxidativo o de ausencia de nutrientes^[57].

Se ha reconocido que durante una invasión inicial, MAP mantienen una supervivencia mayo durante su invasión en macrófagos en una ambiente donde exceden proteínas de tipo FurA pero una menor adaptación post-infección del ambiente citoplasmático del macrófago infectado aunque tiene mayor capacidad de evadir o suprimir el sistema inmunológico inhibiendo la expresión de interferones y la vía del complemento antes de la presentación de antígeno o en una respuesta de inmunidad adaptativa^[57, 58, 59]

Fig. 5. Resumen de procesos celulares modulados por Fur^[57]



MAP y el género *Mycobacterium* contienen Polimorfismos de Secuencias Largas (LSP) que existen por razón de evolución y adaptación a diferentes ambientes. Estas secuencias con función de delección genética para la expresión de diferentes proteínas y secuencias específicas para una supervivencia en un ambiente hostil dan origen a proteínas tipo FUR como MAP3773c, una proteína hipotética tipo FurA y FurB encontrada en LSP15 y que juega un rol importante en la captación y regulación de metales transicionales Fe^{+2} y Zn^{+2} durante la infección del huésped; Esta proteína no ha sido estudiada en su totalidad pero se cree que también es una vía alterna para la expresión de genes como MAP3776c para la biosíntesis de vitamina B12 y su expresión es inducida principalmente por la presencia de Fe^{+2} y Zn^{+2} ^[60, 61, 62].

II. JUSTIFICACION

El impacto que *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* representa, como agente causal de la paratuberculosis bovina, en el sector ganadero es de interés económico y de cuestión de salubridad.

Otra de las preocupaciones a nivel internacional, incluyendo países desarrollados es la infección recurrente a animales de ganado, principalmente rumiantes, por la característica de algunas micobacterias de MAC de evadir el sistema inmunológico o retardarlo en su transcurso patológico, invadiendo principalmente a los macrófagos del huésped.

El estudio de la expresión de la proteína MAP3773c nos ayudara a entender el comportamiento de la proteína, para entender los mecanismos de regulación en la expresión de la proteína en cuestión, tanto a nivel transcripcional y traduccional, en la disposición de hierro por parte de MAP, para su sobrevivencia y efectos en la patogenicidad en el huésped, aportando avances significativos para tratamientos, y métodos de prevención y control de las enfermedades que pudieran estar asociadas con *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

III. HIPÓTESIS

MAP3773c es una proteína constitutiva dependiente de expresión por metales divalentes

III. 1. HIPÓTESIS NULA

MAP3773c no es una proteína constitutiva dependiente de expresión por metales divalentes

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión traduccional de MAP3773c en cultivos de *E. coli*. BL21 (DE3) pRSETmap3773c inducidos con IPTG, FeNTA, ZnSO₄ y FeNTA-Zn SO₄.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar la expresión *E. coli*. BL21 (DE3) pRSETmap3773c en medio LB ampicilina con IPTG y sin IPTG.

Realizar la expresión *E. coli*. BL21 (DE3) pRSETmap3773c en medio LB ampicilina con FeNTA.

Realizar la expresión *E. coli*. BL21 (DE3) pRSETmap3773c en medio LB ampicilina con ZnSO₄.

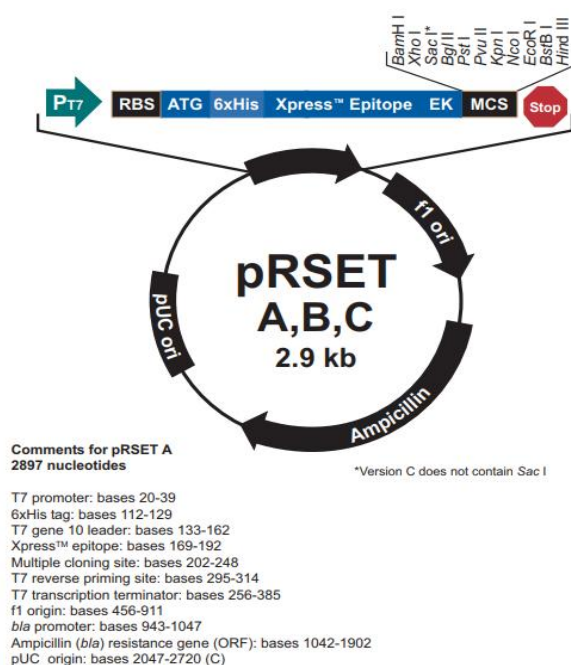
Realizar la expresión *E. coli*. BL21 (DE3) pRSETmap3773c en medio LB ampicilina con FeNTA-Zn SO₄.

VI. Materiales y métodos

VI.1 Transformación de cepa *E. coli* BL-21 con el plásmido pRSET-MAP3773c y sobreexpresión de MAP3773c.

Se utilizó *E. coli* BL-21 como modelo de bacterias competentes y se utilizó el plásmido pRSET-MAP3773c, que fue construido en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Campus Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California por M.C. Vanessa Martínez López (Fig. 6)

Fig. 6 Mapa de pRSET A, B y C ^[63]



VI.2 Cultivo celular e inducción de la expresión de MAP3773c

VI.2.1 Cultivo celular

E. coli BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c y *E. coli* BL-21 sin plásmido fueron cultivados por separado en agar líquido LB *Luria Bertani Broth*; *Himedia labs®*; *Miller M125* en presencia de ampicilina (50 µg/ml) y sin ampicilina respectivamente en condiciones de agitación constante, estériles y térmicas de 37C°, utilizando el equipo *Gyratory bath shaker, New brunswick scientific laboratories; G76* . La inducción de proteína se hizo en bacterias frescas obtenidas de cultivo primario de ambas cepas de *E. coli* dejadas en crecimiento continuo hasta saturar visiblemente medio LB solo en presencia de ampicilina y posteriormente un cultivo nuevo para los diferentes tratamientos. La inducción de MAP3773c se llevo a cabo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM, esto se llevó a cabo en cada experimento como control,

con la finalidad de comparar la expresión de la proteína con los demás tratamientos. La inducción con tratamientos de sulfato de zinc (ZnSO_4), nitrilotriacético ferrico (FeNTA) y ZnSO_4 -FeNTA fueron llevados a cabo por separado a diferentes concentraciones finales (ver Tabla 2) en LB líquido con *E.coli* BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c. Los tratamientos mencionados anteriormente fueron agregados hasta obtener una absorbancia de 0.4 - 0.6 λ en un espectro de absorción de 600nm, determinado mediante espectrofotometría usando el equipo *Genesys 20; Thermo Fisher scientific; 4001/5*. Posteriormente el crecimiento continuo por 4 horas. La biomasa fue obtenida descartando agar LB mediante centrifugación a 6000 rpm en condiciones térmicas de 4 - 0 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se descartó el líquido sobrenadante y biomasa de cada inducción fue resguardada a -20 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Los experimentos se hicieron por duplicado.

Tabla 2. Condiciones de tratamientos de inducción con Zn^{+2} , Fe^{+2} y Zn^{+2} - Fe^{+2} de *E. coli* BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c.

No. de tratamiento	Bacterias + ZnSO_4	Bacterias + FeNTA	Bacterias + ZnSO_4 -FeNTA
1	150mM	100 μM	100mM-100 μM
2	200 mM	200 μM	200mM-200 μM
3	250 mM	300 μM	300mM-300 μM
4	300 mM	400 μM	400mM-400 μM
5	400mM		

VI.2.2 Lisis celular

Para extraer el contenido citoplasmático y someter a una electroforesis SDS-PAGE, se lisaron bacterias de la siguiente manera:

1. Se descongeló la biomasa y se mantuvo en hielo molido para prevenir degradación de proteínas y elementos necesarios.
2. Se pesó biomasa en un rango de 13-15 mg en tubos tipo Eppendorf® y se rotularon dependiendo de cada control y tratamiento
3. Se resuspendió la biomasa agregando 70 µl de solución de lisis (.2 N NaOH, 1% (p/v) SDS) hasta obtener una solución homogénea, translúcida y con baja viscosidad con la finalidad de romper membrana y pared celular, y desnaturalizar en condiciones alcalinas elementos aberrantes (DNA, RNA, elementos estructurales, etc.)
4. Si la viscosidad dificultaba la utilización de micropipeta y manejo del paquete lisado, se sometió a ultrasonificación utilizando el equipo *Ultrasonic cleaner; TPC advanced technology inc; UC 450*. a 60KHz a una temperatura constante de 10 C°.

VI.2.3. Determinación de la expresión de MAP3773c mediante electroforesis por SDS page 12%.

Se tomaron 15 µl por separado de paquete lisado de cada control y tratamiento, y se rotularon en diferentes tubos tipo Eppendorf®. Se agregaron 15 µl de regulador de proteínas 2x el cual se preparó diluyendo 50 µl de β-mercaptoetanol al 98% aforando a 1000 µl con 950 µl de *2x Laemmli sample buffer; Bio rad; Cat. #161-037*. Se homogenizó la mezcla y se sometió a una temperatura constante de 100 C° por 15 minutos usando el equipo *Dry*

bath incubator; Allsheng; MK2000-1. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm a temperatura ambiente usando el equipo *Microcentrifuge 5415; Eppendorf®; 5415 D*. Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis tipo SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12 % los cuales fueron preparados de la siguiente manera:

VI.2.3.1 Gel separador

En un tubo de ensaye se realizó una mezcla para el gel separador en el siguiente orden:

1. 2.40 ml Solución de monómeros
2. 1.50 ml Tris 1.5 M a un pH ajustado a 8.8
3. .12 ml SDS (v/v %) 10%
4. 2.00 ml agua bidestilada
5. 0.045 ml de Persulfato de amonio (w/v %) 10%
6. 0.003 ml N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (*TEMED, Sigma-Aldrich®; T9281*)

Se agregó la mezcla entre dos placas de vidrio separados por .75 mm hasta aproximadamente 3.5 centímetros del borde superior en forma vertical fijados en el equipo *Mini-PRTEAN tetra cell casting; Bio-rad; #1658022EDU*, posteriormente se agregó agua bidestilada hasta cubrir por completo la capacidad entre las dos placas. La fase inferior gelificó e inmediatamente se descartó el agua bidestilada y se procedió a realizar el gel concentrador.

VI.2.3.2 Gel concentrador

En un tubo de ensaye se realizó una mezcla para el gel concentrador en el siguiente orden:

1. 0.33 ml Solución de monómeros

2. 0.50 ml Tris 0.5 M a un pH ajustado a 8.8
3. 0.04 ml SDS (v/v %) 10 %
4. 1.22 agua bidestilada
5. 0.025 ml Persulfato de amonio (w/v%) 10 %
7. 0.002 ml N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (*TEMED*, *Sigma-Aldrich*®, T9281)

Se agregó la mezcla sobre el gel separador entre las placas de vidrio previamente utilizadas y se sobrepuso un peine con la finalidad de formar los pocillos correspondientes para cada tratamiento y llevar a cabo la electroforesis tipo SDS-PAGE al 12 %.

VI.2.3.3 Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12%

Se realizó una electroforesis tipo SDS page al 12% para cada tratamiento cargando 5 µl de marcador de peso molecular (*Precision Plus ProteinTM*; *Bio-Rad*; #1610363) y 14 µl de carga de los tratamientos en el siguiente orden:

Tabla 3. SDS page 12% para el tratamiento con ZnSO₄

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Marcardo	<i>E. coli</i> BL-	<i>E. coli</i> BL-	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
r de peso	21;	21;	BL-	BL-	BL-	BL-	BL-	BL-	BL-
molecular	ampicilin	ampicilin	21(DE3)	21(DE3)	21(DE3)	21(DE3)	21(DE3)	21(DE3)	21(DE3)
	a	a; IPTG	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-
		1mM	MAP3773	MAP3773	MAP3773	MAP3773	MAP3773	MAP3773	MAP3773
			c;	c;	c;	c;	c;	c;	c;
			ampicilin	ampicilin	ampicilin	ampicilin	ampicilin	ampicilin	ampicilin
			a	a;	a; ZnSO ₄	a; ZnSO ₄	a; ZnSO ₄	a; ZnSO ₄	a; ZnSO ₄
				iPTG	150 mM	200 mM	250 mM	300 mM	400 mM
				1mM					

Tabla 4. SDS page 12% para el tratamiento con FeNTA

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Marcador	<i>E. coli</i> BL-21;	<i>E. coli</i> BL-21;	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)
de								
peso	ampicilina	ampicilina;	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-
molecular		iPTG 1mM	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c
			; ampicilina	;	;	;	;	;
				ampicilina;	ampicilina;	ampicilina;	ampicilina;	ampicilina;
				iPTG 1mM	FeNTA	FeNTA	FeNTA	FeNTA
					100 mM	200 mM	300 mM	400 mM

Tabla 5. SDS page 12% para el tratamiento ZnSO₄ - FeNTA

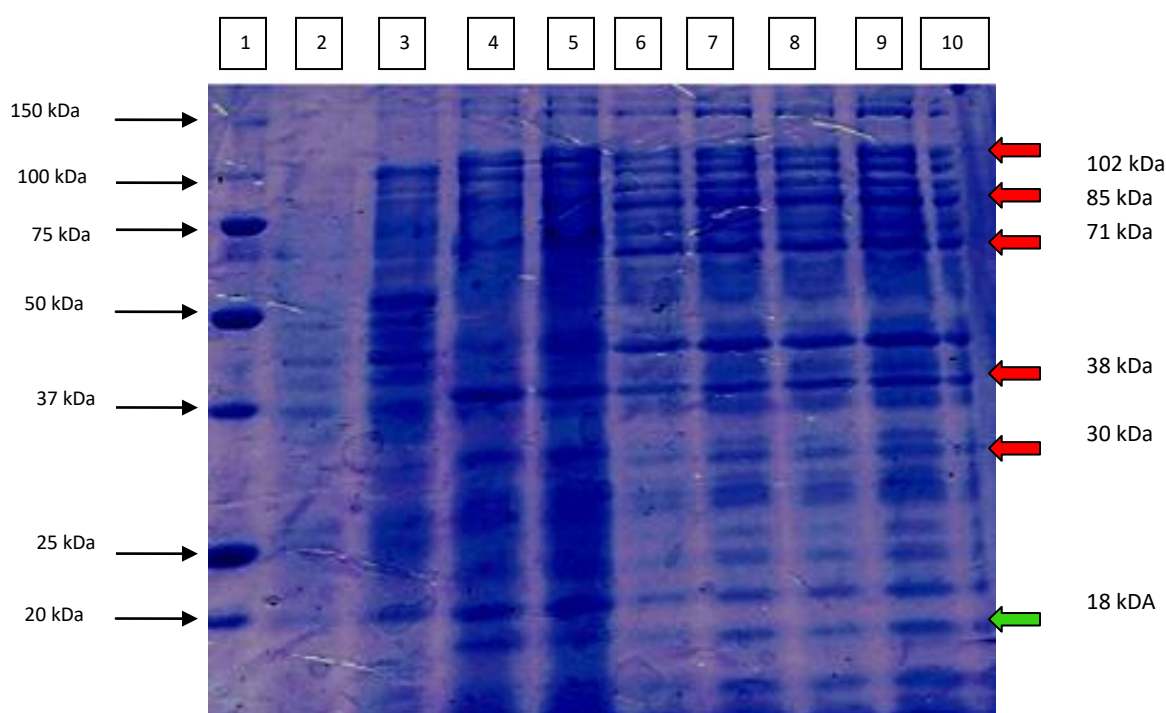
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Marcador	<i>E. coli</i> BL-21;	<i>E. coli</i> BL-21;	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)	<i>E. coli</i> BL-21(DE3)
de								
peso	ampicilina	ampicilina;	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-	pRSET-
molecular		iPTG 1mM	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c	MAP3773c
			; ampicilina	;	;	;	;	;
				ampicilina;	ampicilina;	ampicilina;	ampicilina;	ampicilina;
				iPTG 1mM	ZnSO ₄	ZnSO ₄	ZnSO ₄	ZnSO ₄
					100mM;	200mM;	300mM;	400mM;
					FeNTA	FeNTA	FeNTA	FeNTA
					100 µM	200 µM	300 µM	400 µM

Cuatro geles obtenidos correspondientes al tratamiento con Zn y FeNTA se sometieron a tinción azul de Coomasie (12% Solución azul de Coomasie R250/ 50% Metanol absoluto/ 10% Ácido acético glacial/ 27.5% agua bidestilada) por 8 horas y posteriormente se destiñeron en decolorante para geles de poliacrilamida (50% Metanol absoluto/ 40% Agua

bidestilada/ 10% Ácido acético glacial). Dos geles obtenidos correspondientes al tratamiento en conjunto Zn-FeNTS fueron teñidos con solución de fluorescencia (*Oriole[®] Fluorescent Gel Stain; Bio-Rad; #161-0496*) se interpretaron visualmente mediante exposición por luz ultravioleta.

VII. Resultados

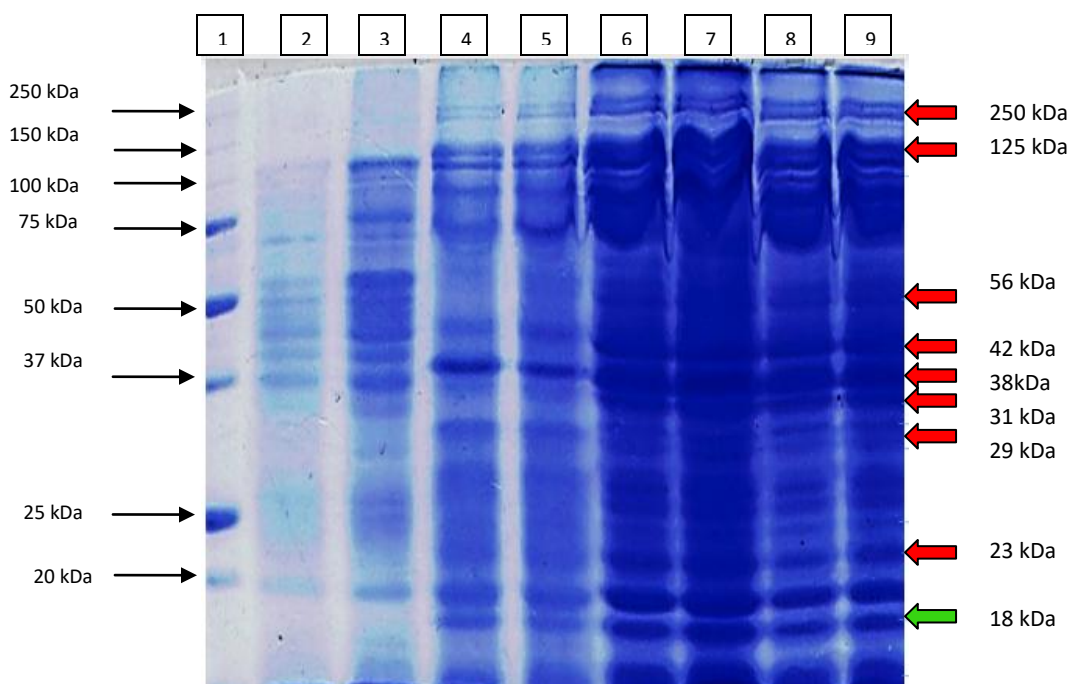
VII.1. Fig. 6 Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12% para el tratamiento de *E. coli* BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c con ZnSO₄



En Fig. 6 se puede observar una sobreexpresión de distintas bandas a diferentes magnitudes respecto al marcador de peso molecular (*Precision Plus ProteinTM; Bio-Rad; #1610363*) ubicado en el carril 1. Los carriles 2 (Correspondiente al control sin plásmido) y 3 (correspondiente al control sin plásmido y con tratamiento de IPTG) no presentan

ninguna sobreexpresión de alguna banda de interés. De manera ascendente, se logra ver una banda de aproximadamente 18 kDa (flecha verde) respecto al marcador de peso molecular en los carriles 4-10 correspondientes a los tratamientos con Zn. En los carriles 6-10 se logra apreciar una sobreexpresión de bandas (flechas rojas) que en magnitud son de 30 kDa, 38 kDa, 71 kDa, 85 kDa, 102 kDa. A diferencia de los carriles 6-10, los carriles 4 (correspondiente a control con plásmido) y 5 (correspondiente a control con plásmido y tratamiento con IPTG) presentan sobreexpresión de bandas de aproximadamente 73 kDa.

VII.2. Fig. 7 Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12% para el tratamiento de *E. coli* BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c con FeNTA



En Fig. 7 se observó una sobreexpresión de distintas bandas a diferentes magnitudes respecto al marcador de peso molecular (*Precision Plus ProteinTM*; Bio-Rad; #1610363) ubicado en el carril 1. De forma ascendente, en los carriles 4 (control con plásmido), 5 (control con plásmido y tratamiento con IPTG) y 6-9 (Bacterias con tratamiento con

FeNTA) se logró apreciar una sobreexpresión de una banda (flecha verde) de aproximadamente 18 kDa respecto al marcador de peso molecular. En los carriles 6 - 9 se logró apreciar una sobreexpresión de bandas (flechas rojas) a diferentes magnitudes respecto al marcador de peso molecular de aproximadamente 23 kDa, 31 kDa, 38 kDa, 42 kDa, 56 kDa, 125 kDa, 250 kDa, estas bandas se expresaron con mayor intensidad a mayor concentración final de FeNTA en los carriles 6 - 9.

VII.3. Fig. 8 Electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 12% para el tratamiento de *E. coli* BL-21(DE3) pRSET-MAP3773c con Zn-FeNTA

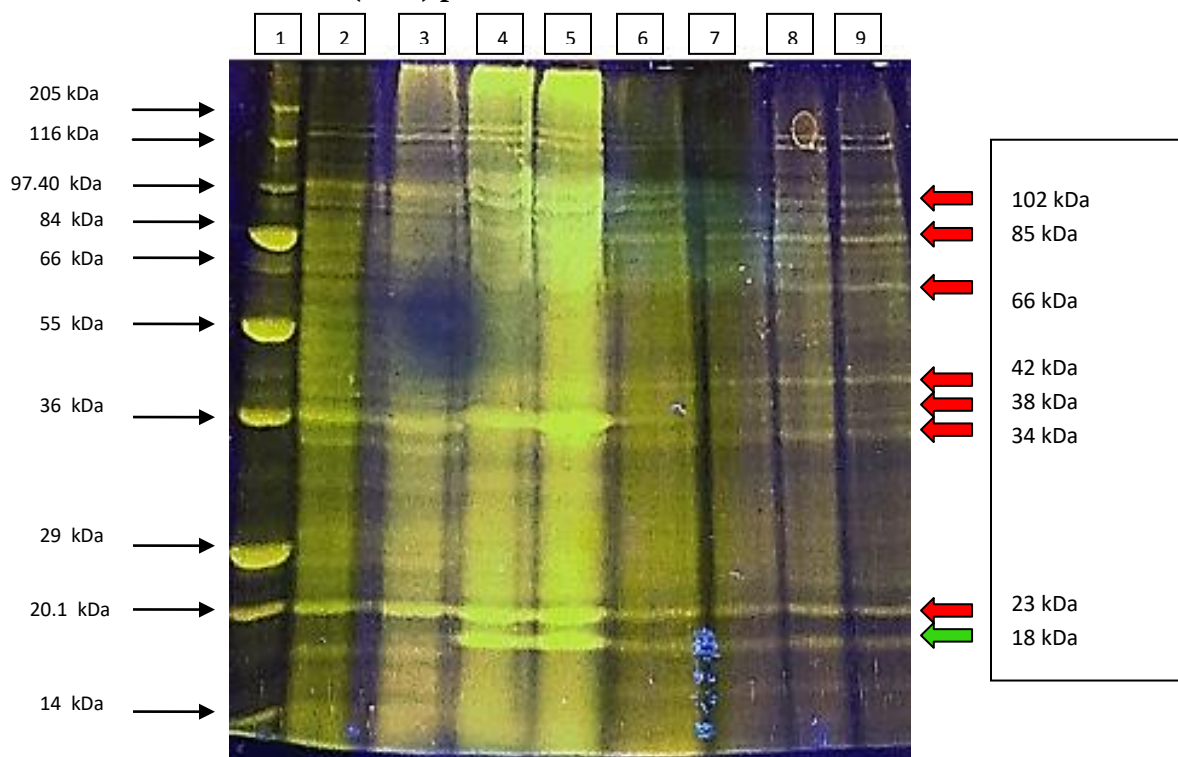


Fig. 8 presenta diferentes bandas de sobreexpresión de proteínas a diferentes magnitudes del marcador de peso molecular (*Sigma marker, Wide range, molecular weight 6,500-200,00 Da; Sigma-Aldrich®; #S8445*) ubicado en el carril 1. De manera ascendente, los carriles 3 (correspondiente al control con plásmido) y 4 (correspondiente al control con plásmido y tratamiento con IPTG) mostraron sobreexpresión en bandas a diferentes magnitudes respecto al carril 1, se logró apreciar una banda de aproximadamente 18 kDa (flecha verde) que indica ser la proteína de interés, también se lograron apreciar bandas (flechas rojas) de aproximadamente 23 kDa, 38 kDa exclusivamente en los carriles mencionados. En los carriles 5-9 (correspondientes a los tratamientos de bacterias con

plásmido y tratamiento a diferentes concentraciones finales en conjunto de Zn-FeNTA) se lograon apreciar bandas a diferentes magnitudes respecto al marcador de peso molecular que presentaban mayor intensidad a mayor concentración final del tratamiento con Zn-FeNTA, las bandas tuvieron un peso de aproximadamente 18 kDa (flecha verde) indicando la proteína de interés y de 23 kDa, 34 kDa, 38 kDa, 42 kDa, 66 kDa, 85 kDa y 102 kDa (flechas rojas) exclusivamente en los carriles mencionados.

VIII. Discusión

En Fig. 7 se apreciaron mayor número de sobreexpresiones a comparación de Fig. 6 y Fig. 8 (Flechas rojas y flecha verde). En Fig. 6, 7 y 8, se logró obtener una banda que presumiblemente es la hipotética proteína MAP3773c de aproximadamente 17 kDa (flecha verde) en los carriles 4-9. Es posible que el crecimiento bacteriano en un ambiente saturado de hierro promueva la formación de homopolímeros, Fig. 7 y sea la razón por lo que la expresión de diferentes bandas a diferentes magnitudes respecto al marcador de peso molecular sea visiblemente apreciable en los carriles 4-9^[57,64,65]. FUR es un represor transcripcional dependiente de hierro y ZUR es un represor transcripcional dependiente de zinc, metales transicionales altamente abundantes en el organismo que por su naturaleza trivalente deben ser reducidos para introducirse al citoplasma de MAP; Una vez que estos metales transicionales saturan las denominadas cajas FUR y ZUR suprimen diversas actividades biológicas como la biosíntesis de sideróforos o factores de virulencia que pudieran favorecer la captación de hierro y comprometer el interior citosólico por radicales libres por ejemplo los patógenos hemolíticos como *Vibrio fulnificus*, *Bacillus parahemaemolyticus*, *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* ^[66, 67, 68]

La regulación de proteínas por represión dependiente de saturación de metales transicionales ha sido reportada como un método de supervivencia durante su invasión

intracelular granulomatosa en macrófagos intestinales y una de las estudiadas hasta la fecha es la represión de expresión de proteínas membranales dependientes de hierro ferroso u otros metales transicionales divalentes. La represión de estas proteínas resulta favorable para el patógeno invasor debido que a menor expresión de proteínas membranales menor será el estímulo de detección de antígenos por anticuerpos del huésped, lo que lo haría susceptible a la supervivencia de MAP y sería la razón por la que tarda tanto la inmunidad adaptativa en dar una respuesta celular ^[47,48,69]

En Fig. 6,7 y 8 se observó una expresión de la proteína MAP3773c a 17 kDa (flecha verde) en los carriles 4 y 5 correspondientes a los controles de bacterias sin tratamiento de metal transicional correspondiente a cada inducción, la banda no se expresó con la intensidad de los tratamientos en los carriles posteriores, pero aun así en la ausencia de los metales se expresó lo que indica que MAP3773c puede ser una proteína de tipo constitutiva y que funciona como un regulador satelital aun así cuando existe una deprivación de metales transicionales, esto también lo sustenta el hecho de que la expresión de MAP3773c con IPTG presento una similitud de expresión en comparación con la inducción de expresión con hierro (FeNTA) y con zinc (ZnSO₄), lo que nos indica que la inducción de MAP3773c con IPTG es entendible por el promotor de T7, reconocido por la ADN polimerasa y contenido en el plásmido pRSET-A, pero en el caso de la inducción con los metales mencionados y sin IPTG, como la ADN polimerasa puede realizar tal trabajo, lo que creemos es que MAP3773c se expresa sin IPTG tal como se comprueba experimentalmente con la cepa de *E.coli* pRSETmap3773c sin IPTG; por tal razón podemos determinar que MAP3773c es una proteína constitutiva.

IX. Conclusión

Se logró determinar que la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* por inducción con los metales transicionales Fe^{+2} , Zn^{+2} y $\text{Fe}^{+2}\text{-Zn}^{+2}$ en conjunto mediante una electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% que la proteína MAP3773c puede ser una proteína de tipo constitutiva aun cuando hay una deprivación de metales transicionales y que podría funcionar como un represor transcripcional satelital en *E.coli*, cuestión que comprobaremos en un futuro en MAP, cuestión que es importante para el patógeno, para promover la supervivencia intracelular de MAP durante una invasión del huésped en una infección granulomatosa. Este hallazgo a la fecha permanece sin estar claro por lo que como mencionábamos hacen falta estudios a nivel molecular que deben llevarse a cabo *in vivo* en modelos animales para identificar si MAP3773c podría ser un blanco clave como tratamiento contra la paratuberculosis.

X. Referencias

1. Kazda J. The ecology of Mycobacteria Nueva York: Springer Science & Business Media; 2012.
2. King H, Khera T, James P, et al. Environmental reservoirs of the pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. Plos one 12 (3). 2017;; p. 1 - 15.
3. Rodríguez C. Mycobacteria. In república Udl. Temas de bacteriología y virología médica (2da edición). Uruguay: Oficina del libro FEFMUR; 2006. p. 381 - 399.
4. Sampere M, Guillén V, Luengo F. Composición química, biosíntesis, actividad biológica y estructuración de lípidos y polisacáridos de Mycobacterium. Murcia: Secretariado de publicaciones; 1993.
5. Valdés F, Cid A. Micobacterias atípicas. Actas dermosiliográficas 96 (6). 2004;; p. 331 - 357.
6. Koh W, Kwon O, Soo K. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. Korean Journal of Radiology 3 (3). 2002;; p. 145 - 157.

7. Levy V, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42 (2). 1992;; p. 315 - 323.
8. Singh G, Kumar A, Maan P, Kaur J. Cell wall associated factors of *Mycobacterium tuberculosis* as major virulence determinants: Current perspectives in drugs discovery and design. *Curr drug targets*. 2017; 18(16): p. 1904 - 1918.
9. Daffé M, Drapper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microbm Physiol*. 39. 1998;; p. 131 - 203.
10. Marrakchi H, Lanéelle M, Daffé M. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & Biology* 21 (1). 2014;; p. 67-85.
11. Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, al. e. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of bacteriology* 190 (6). 2008;; p. 5672 - 5680.
12. Minnikin D. *Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles*. 1era edición Londres: Academic press; 1982.
13. Liu J, Barry C, Besra G, H. N. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *The journal of biological chemistry* 271 (47). 1996;; p. 29545-29551.
14. Barry C, Lee R, Mdluli K, Sampson A, B. S, Yuan Y. Mycolic acids: Structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in lipid research* 37 (2-3). 1998;; p. 143 - 79.
15. Schmitt E, Jahreis K, Eddy M, Amon J, Burkowski A, Tietz M. Identification of a glucose permease from *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 16 (3-4). 2009;; p. 169 - 75.
16. Cook G, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, al. e. Physiology of mycobacteria. *Advances in microbial physiology*, 55. 2009;; p. 81 - 319.
17. Tietz M, Amon J, Parche S, Mahfoud M, al. e. A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology* 189 (6). 2007;; p. 5903 - 5915.
18. Takamaya K, Wang L, David H. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2 (1). 1972;; p. 29-35.
19. Acha P, Szyfres B. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals Vol.*

- 1 Washington: Panamerican health org.; 2001.
20. saxefard G, Baess I. Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis*, and "wood pigeon mycobacteria." Determinations by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 96. 1988;; p. 37-42.
21. Turenn C, Wallace R, Behr M. *Mycobacterium avium* in the Postgenomic Era. *Clinical Microbiology Reviews* 20 (2). 2007;; p. 205 - 229.
22. Inderlied C, Kemper C, Bermudez L. The *Mycobacterium avium* Complex. *Clinical microbiology reviews* 6 (3). 1993;; p. 266-310.
23. Thore M, Krichevsky M, Levy-Fr  bault V. Numerical taxonomy of *Mycobactin*-dependent mycobacteria. Emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* , *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, and *Mycobacterium avium* subs.*silvaticum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40 (3). 1990;; p. 254-260.
24. Young L, Berlin C, Gottlieb M. *Mycobacterial* infections in AIDS patients, with emphasis on the *Mycobacterium Avium* Complex. *Infect. Dis.* 1986;; p. 1023 - 1033.
25. Morales JJ. Infecci  n por micobacterias no tuberculosas en pacientes por el virus de inmunodeficiencia humana. *Bolet  n M  dico del Hospital Infantil de M  xico*. 2007;; p. 192-199.
26. Wahl S, Greenwell T, Peng G, Donze H, Doherty T, Mizel D, et al. *Mycobacterium avium* complex augments macrphage HIV-1 production and incresees CCR5 expression. *Prceedings of th National Academy os Science of the United States of America* 95 (21). 1998;; p. 12574-12579.
27. Norton C, LeChevallier M. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and evornmental microbiology* 66 (1). 2000;; p. 268-76.
28. Biet F, Boschioli M, Thorel M, Guilloteau L. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Veterinary research* 36. 2005;; p. 411-436.
29. Fortea J, Gisbet J, Mar  n I. Papel de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn. *Gastroenterolog  a y Hepatolog  a* 32 (5). 2009;; p. 353-363.
30. Chiodini R, Kruiningen V, Merkal R. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *The Cornell veterinerian*. 74 (3);: p. 218-62.

31. Payeur B, Jarnagin J, Marquardt J, Schaper L, Martina M. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. Iowa; 1993.
32. Li L, Bannantine J, Zhang Q, Amonsin A, May B, Alt S, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America 102 (35). 2005;; p. 12344-12349.
33. Janagama H, Senthilkumar T, Bannantine J, Rodríguez G, Smith I, et al. Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*. Microbiology 155 (Pt 1). 2009;; p. 3683-3690.
34. Zhu X, Ranjan S, Vindal V, Janagama H, Naser S, Sreevatsan S. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. Microbes infect 10. 2008 Octobre; 10(13): p. 1274-1282.
35. Wheeler W, Hanks J. Utilization of external growth factors by intracellular microbes: *Mycobacterium paratuberculosis* and wood pigeon mycobacteria. Journal of bacteriology 89 (3). 1965;; p. 889-896.
36. Harris J, Lamerding A. Crohn's disease and *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: current issues. Journal of food protection 64 (12). 2001;; p. 2103-10.
37. Bannantine J, Bachleri E, Zhang Q, Ling L, Kapur V. Genome scale comparison of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. Journal of clinical microbiology 40 (4). 2002;; p. 1303-1310.
38. Van Zandt K, Sow F, Florence W, Zwilling B, Satoskar A, Schlesinger S, et al. The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. Journal of leukocyte biology 85 (3). 2008;; p. 689-700.
39. De Voss J, Rutter K, Schroeder B, Barry C. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. Journal of bacteriology 181 (15). 1999;; p. 4443-4451.
40. Messenger A, Barclay R. Bacteria, iron and pathogenicity. Biochemistry and molecular biology education 11 (2). 1983;; p. 54-63.
41. Ojha A, Hatfull G. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. Molecular microbiology 66 (2). 2007;; p. 468-483.
42. Weigand P, Goethe R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

- infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and infection* 1 (13). 1999;; p. 1121-1127.
43. Sweeney R, Collins R, Koets A, McGuirk S, Roussel A. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of veterinary internal medicine* 26 (6). 2012;; p. 1239-1250.
 44. Kalis C, Collins M, Hesselink J, Barkema H. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary microbiology* 97 (1-2). 2003;; p. 73-86.
 45. Tiwari A, VanLeeuwen J, McKenna S, Keefe G, Barkema H. Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian veterinary journal* 47 (9). 2006;; p. 874-882.
 46. Landeros B, Gutierrez J, Medina G, Renteria E, Díaz E, Oshima S. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis down-regulates mRNA expression of iron-induced macrophage Ferroportin 1. *Veterinaria México* 3 (1). 2016;; p. 1 - 12.
 47. Waters W, Stabel J, Sacco R, Harp J, Pesch B, Wannemuehler M. Antigen-specific B-Cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle. *Infection and immunity* 67 (4). 1999;; p. 1593-1598.
 48. Arsenault R, Pekka M, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S. From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary research* 45 (1). 2014;; p. 54.
 49. Kirkeby C, Graesboll K, Saxmose S, Christiansen L, Toft N, Rattenborg E, et al. Simulating the epidemiological and economic impact of paratuberculosis control actions in dairy cattle. *Frontiers in veterinary science* 3 (90). 2016;; p. 1-13.
 50. Statista. The statistics portal. [Online].; 2018. Available from: <https://www.statista.com/statistics/502280/global-dairy-market-value/>.
 51. Milián F, Santillán M, Zendejas H, García L, Hernández L, Cantó , et al. Prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in dairy cattle in Mexico. *Journal of veterinary medicine and animal health* 7 (10). 2015;; p. 302-307.
 52. Troxell B, Hassan H. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3 (59). 2013;; p. 1-13.
 53. Imlay J, Chin S, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240 (4852). 1988;; p. 640-2.

54. Wolfe M. Developing therapeutics for Alzheimer's disease: Progress and challenges Boston, MA: Academic Press; 2017.
55. Griggs D, Tharp B, Konisky J. Cloning and promoter identification of the iron-regulated *cir* gene of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 169 (2). 1987;; p. 5343-5352.
56. Escolar L, Pérez J, Lorenzo V. Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology* 181 (20). 1999 ;; p. 6223 - 6229.
57. Fillat M. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of biochemistry and biophysics* 546. 2014;; p. 41-52.
58. Eckelt E,MT,MJ,LK,NA,JM,...GR. *Frontiers in microbiology*. [Online].; 2015. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00016>.
59. Lamont E, Xu W, Sreevatsan S. *Biomed central genomics*. [Online].; 2013. Available from: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-694>.
60. Eckelt E, Jarek M, Frömke C, Meens J, Goethe R. Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *BioMedCentral genomics* 15 (1). 2014;; p. 1076.
61. Alland D, Lacher D, Hazbón M, Motiwala A, Qi W, Fleischmann R, et al. Role of Large Sequence Polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the utility of LSPs in phylogenetic analysis. *Journal of microbiology* 45 (1). 2007;; p. 39-46.
62. Wang J, Moolji J, Dufort A, Staffa A, Domenech P, Reed M, et al. Iron acquisition in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of bacteriology* 198 (5). 2016;; p. 857-866.
63. Invitrogen. *Thermofisher*. [Online].; 2010. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/prset_man.pdf.
64. Ibarra G. Caracterización bioquímica parcial y funcional de la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Universidad Autónoma de Baja California; Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. 2016.
65. Kommineni S, Lama A, Popescu B, Nakano M. Global transcriptional control by NsrR in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 194 (7). 2012;; p. 1679-1688.
66. Lee H, Kim J, Lee M, Park S, Lee K. Regulation of haemolysin (Vvha) production by ferric uptake regulator (Fur) in *Vibrio vulnificus*: repression of *vvhA* transcription by Fur and proteolysis of

- Vvha bye Fur-repressive exoproteases. *Molecular microbiology* 88 (4). 2013;; p. 813-826.
67. Ebanks R, Goguen M, Knickle L, Dacanay LA, Ross N, Pinto D. Analysis of a ferric uptake regulator (Fur) knockout mutant in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Veterinary microbiology* 162. 2013;; p. 831-841.
68. Kehres D, Janakiraman A, Slauch J, Maguire M. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* Transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. *Journal of bacteriology* 184 (12). 2002;; p. 3151 - 3158.
69. Furano K, Campagnari A. Inactivation of the *Moraxella catarrhalis* 7169 Ferric Uptake Regulator increases susceptibility to the bactericidal activity of normal human sera. *Infection and immunity* 71 (4). 2003;; p. 1843-1848.