

I.INTRODUCCION

Capítulo I.1.

Paratuberculosis

La Paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enteritis crónica granulomatosa causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), formalmente descrita por primera vez en 1895 por los doctores Heinrich Albert Johne y Langdon Frothingham^[4]. La Paratuberculosis afecta principalmente animales rumiantes^[3], es frecuente en los animales domésticos y muchas especies de la fauna silvestre en todo el mundo, incluidos los primates^[4,10] y en especies como mamíferos, aves, ovejas, cabras, llamas, alpacas, camellos, alces, alces americanos, búfalos, ciervos, renos, conejos, gatos, zorros, armiños, comadrejas, osos, mapaches, armadillos, zarigüeyas y ratones de la madera^[4]. La Paratuberculosis en animales rumiantes se ha traducido en importantes pérdidas económicas para las industrias de lácteos y ganado de carne,^[1] afecta a alrededor del 10 al 15% en las economías industrializadas de Europa, Norteamérica, Australia, y Japón, con un aumento de la prevalencia en las poblaciones en las economías en desarrollo de Asia^[4,7]. La paratuberculosis se ha visto obstaculizada por pruebas de diagnóstico que no pueden detectar consistentemente al animal infectado^[2]. El control de la enfermedad de Johne requiere buenas prácticas de manejo del hato, como la prevención de la contaminación fecal de los alimentos y el agua^[8]. La infección se caracteriza por una fase subclínica prolongada que conduce finalmente a una gastroenteritis severa que resulta en la desnutrición, se caracteriza por debilitamiento irreversible, diarrea y en última instancia la muerte^[5,11,12] que usualmente ocurre en animales entre los 3 y 5 años de edad^[4]. Se supone que los animales se infectan a temprana edad y pueden desarrollar una variedad de respuestas: la resistencia a la infección, el estado asintomático en el que permanecen los animales a la infección subclínica en la vida, o la enfermedad clínica.^[6,11] La principal vía de transmisión de la enfermedad de John es por vía fecal-oral. Fuentes de exposición MAP incluyen la leche o el calostro que contienen bacilos MAP, o pastos contaminados, alimentación, suelo, agua y otras superficies.^[4,11] Diferentes respuestas patológicas también se han detectado en los animales infectados, tanto en los casos naturales y experimentales en función de la intensidad, localización, tipos celulares y el número de bacilos ácido-alcohol resistentes presentes en los granulomas. Brevemente, estas lesiones se dividen en formas focales, caracterizados por la presencia de pequeños granulomas restringidas a los placas de Peyer; lesiones multifocales con granulomas presentes en la

mucosa intestinal, independientemente de su asociación con el tejido linfoide, formas difusas, relacionadas con los signos clínicos, caracterizado por una enteritis granulomatosa generalizada y difusa ^[6] . Cuando un animal infectado es finalmente detectado en un rebaño, a menudo es un reflejo de los eventos de transmisión que se produjeron muchos años antes, tal vez durante un período tan largo como la duración subclínica. Por lo tanto, la detección de animales clínicamente infectados o signos notables de la Paratuberculosis o enfermedad de Johne, son sólo la "punta del iceberg". Esto se conoce como el fenómeno de "iceberg" un fenómeno común en muchas enfermedades endémicas, en los que más infecciones son desapercibidas porque residen dentro del grupo subclínico o no se detectan. Casos clínicos diagnosticados (ubicados en la punta del iceberg) son los primeros en llamar la atención, y los casos subclínicos (sin ser visto por debajo de la superficie del océano) son a menudo imperceptibles pero presentes ^[11,13] .

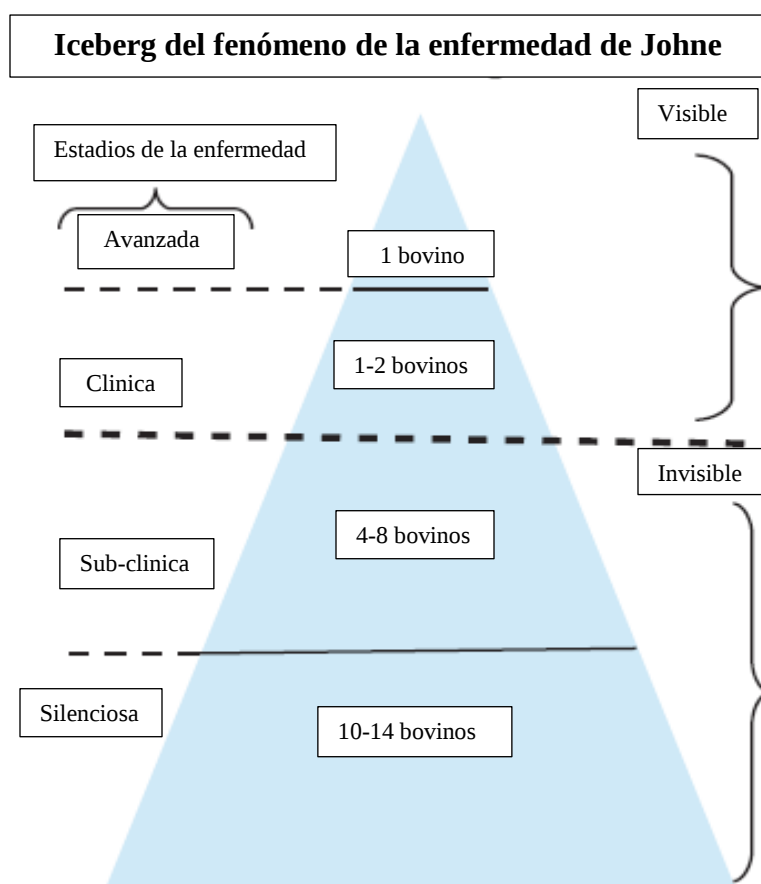


Figura 1. Iceberg de la Paratuberculosis o enfermedad de Johne. Adaptado apartir del articulo Evaluation of the "Iceberg Phenomenon" in Johne's Disease through Mathematical Modelling. Gesgam Magombedze1, Calistus N. Ngonghala1, Cristina Lanzas. October 2013 | Volume 8 | Issue 10 | e76636

De acuerdo a diferentes estudios, cerca del 46% del ganado, 51% de borregos, y 50% de cabras en un ambiente contaminado con MAP no muestran ningún signo de infección ^[58] .

I.1.1 Antecedentes de la paratuberculosis o enfermedad de Johne.

En 1865, el cirujano francés, Jean Antoine Villemin, inicia sus experimentos inyectando esputo de humanos infectados con tuberculosis a conejos demostrando la naturaleza de la infección de la tuberculosis por primera vez. Robert Koch adoptó y mejoró las herramientas de una gran variedad de campos (microscopia, manipulación de células, tinción, fotografía, esterilización y aislamiento de cultivos puros) para sistematizar análisis de bacterias patógenas por primera vez. También desarrollo técnicas para la producción de la tuberculina (antígeno micobacteriano no infeccioso) esperando que pudiera ser un tratamiento terapéutico. ^[4]

En 1826, se reconoció una enfermedad intestinal crónica debilitante de ganado. Sus características y causas (etiología) no eran de ningún trastorno conocido actualmente. No fue sino hasta 1894 que la enfermedad fue reconocida como una enfermedad infecciosa con una etiología única. ^[4]

El 23 de octubre de 1894, en la región de Oldenburg de Alemania, un agricultor compró una vaca que no pudo producir leche o ganar peso de manera satisfactoria. Un veterinario local con el nombre de Herr Frederick Harmes examinó la vaca y tomando nota de la diarrea y pérdida de peso, sospecha de tuberculosis intestinal. La vaca dio negativo por la prueba de la tuberculina sin embargo, la vaca murió en la siguiente primavera y el Dr. Harmes envió sus intestinos y el estómago para su examen a la Unidad de Patología Veterinaria en Dresden. Allí los tejidos fueron examinados por el Dr. H. A. Johne y el Dr. L. Frothingham, un científico visitante de la Unidad de Patología en Boston, Massachusetts. Se dieron cuenta que la mucosa intestinal estaba engrosada y había agrandamiento de los ganglios linfáticos mesentéricos. En el examen histológico, se encontraron que la pared intestinal fue fuertemente infiltrado por leucocitos y células epiteloideas y células gigantes ocasionales. El uso de un tinte ácido-alcohol resistentes, permitió la observación de abundantes bacterias ácido-alcohol resistentes (tinción roja) que fueron vistos en los tejidos inflamados. Aunque los organismos se parecían a las bacterias que causaron la tuberculosis, una muestra del tejido infectado que contiene los organismos no pudo causar la enfermedad cuando se inyecta en los conejillos de indias. Johne y Frothingham concluyeron que la enfermedad observada en la vaca fue causada por la bacteria que causa la tuberculosis en las aves (*Mycobacterium avium*), y en reconocimiento de la similitud anatomopatológica de tuberculosis intestinal (por lo general causada por la bacteria que causa la tuberculosis en el ganado bovino, *Mycobacterium bovis*), propuso el nombre de "enteritis pseudotuberculosis" para la enfermedad. A principios de 1900, enteritis pseudotuberculosis fue bien reconocida como una enfermedad nueva y que estaba muy

extendida. Los científicos proponen una variedad de nombres alternativos para la enfermedad, tales como la paratuberculosis y enteritis hipertrófica. En el Informe Anual de 1906 del director del Royal Veterinary College, J. McFadyean acuñó el término "enfermedad de Johne" La década de 1910 fue testigo de muchos descubrimientos sobre la enfermedad de Johne. ^[4]

En 1906, en Dinamarca, Bernhard Bang aprendió que los animales con la enfermedad de Johne respondieron débilmente o nada en absoluto a la inyección intradérmica de antígenos preparados a partir de la bacilo de la tuberculosis (*Mycobacterium bovis*), pero respondió bien a la tuberculina aviar (antígenos preparados a partir de *Mycobacterium avium*). ^[4]

Una observación casual del científico británico Frederick William Twort, lo llevó al aislamiento del agente etiológico de la enfermedad de Johne al observar pequeñas colonias de bacterias en crecimiento como satélites alrededor de las colonias más grandes en los cultivos viejos que se disponía a desprender. Las colonias más grandes eran contaminante del bacilo del heno común, *Mycobacterium phlei*. Ante la sospecha de que las bacterias de *M. phlei* estaban proporcionando algún nutriente esencial, Twort incorpora una preparación por calor de *M. phlei* en su medio de cultivo. Este nuevo descubrimiento del medio de cultivo, apoyó el crecimiento de una nueva bacteria ácido-alcohol resistente. Lo llamó "*Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne's". ^[4]

En la década de 1920, la paratuberculosis fue descrita en los continentes africano y asiático. La paratuberculosis se describió en América del Sur y en el continente de la India durante la década de 1930, completando así la evidencia de la distribución mundial de la enfermedad. En la década de 1940, la paratuberculosis fue reconocida como un problema no sólo en el ganado sino también en la vida silvestre. ^[4]

La nueva era de la investigación de la paratuberculosis se introdujo con el descubrimiento de un elemento genético único para *M. paratuberculosis*. Esta secuencia de nucleótidos en el ADN cromosómico del organismo que se descubrió de forma independiente por Des Collins en Nueva Zelanda y el equipo de investigación dirigido por JJ McFadden en Inglaterra en 1989. La secuencia se encontró que era un elemento de inserción y fue designado IS900. Fue el primer elemento de inserción jamás registrado en micobacterias. En el año 2005 se publica la secuencia del genoma completo de MAP K-10. ^[4,14]

Capítulo I.2.

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

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es un miembro del complejo de *Mycobacterium avium* complex (MAC).^[23] Es el agente etiológico de la paratuberculosis o enfermedad de Johne.^[4,7,15] MAP es una bacteria patógena obligado, intracelular facultativo que mide 0,5 x 1,5 micras en forma de barra que reside principalmente en macrófagos.^[18] Además requiere hasta 16 semanas o más para su crecimiento en cultivos.^[14] Otro fenotipo característico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* es su requisito del sideróforo micobactina en el laboratorio para su crecimiento.^[23] Se ha demostrado que juega un papel importante en varias enfermedades autoinmunes.^[16] Este patógeno veterinario también ha sido implicado como el agente etiológico de la enfermedad de Crohn, llevando a los investigadores a especular sobre un potencial papel patogénico de este organismo en los seres humanos.^[17] Evidencias de que MAP puede estar asociada con la enfermedad de Crohn en humanos incluyen la similitud entre los signos clínicos de la enfermedad de Crohn y los que se encuentran en los animales con paratuberculosis; detección de MAP en las heces, tejidos intestinales, la leche materna, los macrófagos, y de la sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Crohn; las respuestas inmunes celulares y humorales, terapia con antibióticos contra MAP resulta en la reducción de la bacteriemia y la remisión o mejora sustancial en la condición de la enfermedad en muchos pacientes.^[19]

En relación con los signos clínicos, que se caracterizan por una enteritis granulomatosa generalizada y difusa se ha sugerido que estas diferencias podrían estar relacionadas con la respuesta inmune montada por el huésped de tal manera que un gran número de animales asintomáticos con lesiones focales o multifocales muestran una intensidad de células mediada por la respuesta inmune, mientras que la detección de la inmunidad humoral podría estar relacionado con la enfermedad clínica. También hay evidencia que sugiere que estas variaciones en patogénesis podría ser debido a diferencias en el microorganismo.^[6]

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es de crecimiento lento, miembro resistente de la familia Mycobacteriaceae. El organismo es un patógeno intracelular rodeado por la pared celular compleja característica rica en lípidos tripartita de esta familia bacteriana. *Mycobacterium paratuberculosis* comparte un 99% de homología (ADN) con *M. avium* subsp. *avium*, una causa de la tuberculosis en las aves, y el 16S de ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), Sin embargo, las diferencias fenotípicas entre estos dos organismos son considerables.^[20] Las micobacterias son notoriamente resistentes a factores físicos y

químicos. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* parece ser uno de los más resistentes de este grupo. Esto explica la capacidad del organismo para persistir en el medio ambiente, una característica integral de la epidemiología de la infección. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* es más termorresistente que *M. avium*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum* y *M. xenopi* [20]. Las micobacterias son inmunógenos potentes, que inducen anticuerpos y respuestas inmunes mediadas por células. ^[24]

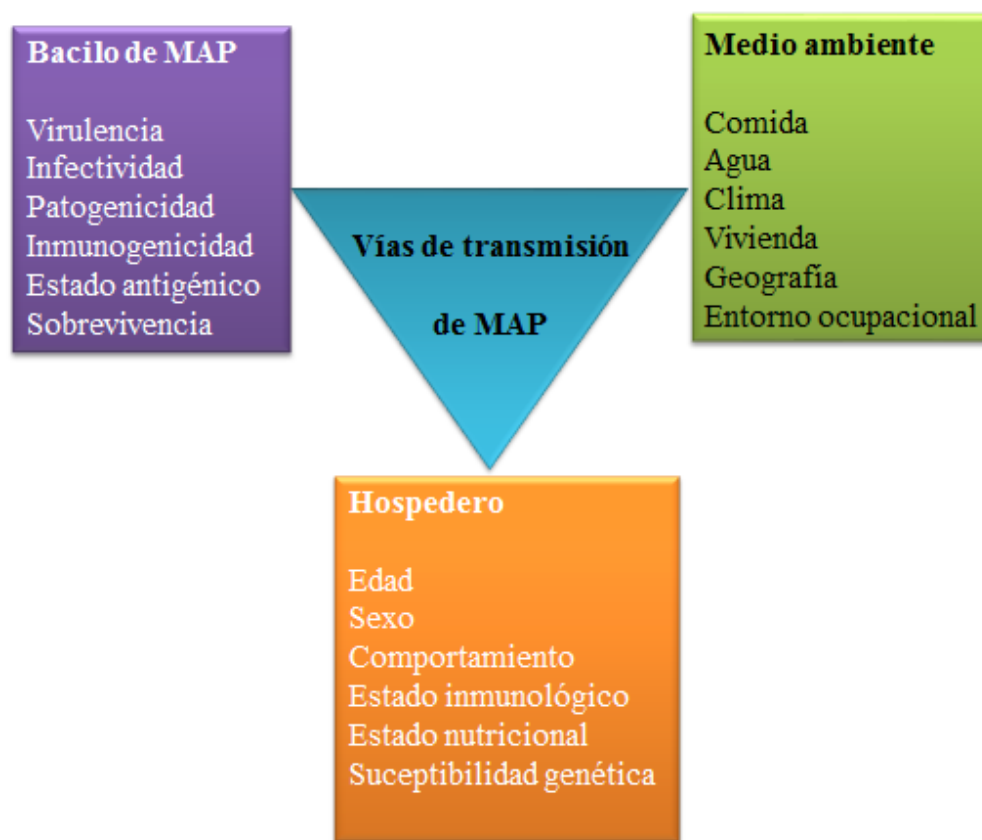


Figura 2. Ilustración esquemática de diferentes modos de transmisión y factores que determinan la patogenicidad de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Adaptado apartir del artículo *Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis and Crohn's Regional Ileitis: How Strong is Association?* Sarman Singh, Krishnamoorthy Gopinath. *Journal of Laboratory Physicians* / Jul-Dec 2011 / Vol-3 / Issue-2

La susceptibilidad a la infección por micobacterias resulta de una compleja interacción entre el huésped y los factores genéticos bacterianos.^[21] La respuesta inmune mediada por células disminuye con la progresión de la enfermedad y cuando esto ocurre, una respuesta inmune humoral se convierte en medible.^[28] Es probable que la infección esté vinculada a la maduración de la inmunidad celular y la capacidad limitada de los animales muy jóvenes para hacer frente a los patógenos intracelulares tales como *M. paratuberculosis*. Los animales adultos también pueden infectarse si se exponen a una dosis suficientemente grande y / o frecuente del organismo.^[20] Micobacterias patógenas también bloquean la actividad antimicrobiana en el fagosoma, incluyendo radicales de óxido nítrico y oxígeno.^[27]

Una fuerte correlación entre la intensidad de la diseminación y la formación de anticuerpos específicos se ha observado en la mayor proporción de animales positivos de anticuerpos que puede ser encontrado en los animales derramando grandes cantidades de MAP.^[25] Los fagocitos mononucleares desempeñan un papel fundamental en la detección y eliminación de microorganismos patógenos y la iniciación de una respuesta inmune adaptativa. A pesar de esto, micobacterias patógenas han desarrollado mecanismos para sobrevivir dentro de los fagocitos mononucleares mediante el bloqueo o la modulación de actividades antimicrobianas de macrófagos. Adicionalmente, el medio ambiente intracelular parece proteger al organismo de mecanismos antimicrobianos extracelulares del huésped.^[19] La resistencia genética a patógenos intracelulares tales como micobacterias se atribuye al menos en parte a la proteína 1 asociada a la resistencia natural de macrófagos del gen (NRAMP1).^[20] Esta proteína es un transportador de metal de transición divalente que regula la activación de los macrófagos en las enfermedades infecciosas y autoinmunes, también ejerce un papel en la resistencia a patógenos intracelulares.^[22] Este gen también puede ser relevante para el control de las primeras fases de la infección por *M. paratuberculosis*, aunque la evidencia completa para este aún no se ha presentado.^[20]

El organismo se cree que generalmente cruza desde el lumen del intestino delgado en el sistema linfático a través de las células M. La bacteria se recoge a continuación por los macrófagos epiteliales que, una vez activado, provocan la activación de células T y la expansión clonal.^[20] Los estudios in vitro muestran que *M. avium* subsp. *paratuberculosis* proliferan dentro de los macrófagos. Esto tal vez, en parte, debido a la inhibición de la acidificación del fagosoma y la fusión fagosoma-lisosoma. Las citoquinas parecen modular a los macrófagos en la matanza de los organismos.^[26] Para comprender plenamente la compleja relación huésped-patógeno, debemos entender las complejas interacciones moleculares que ocurren entre el huésped y el organismo. Las micobacterias han desarrollado numerosos mecanismos para la introducción de los fagocitos mononucleares. Estas interacciones comienzan cuando la pared celular del organismo interactúa con receptores de membrana celular de la célula huésped y se inicia la señalización celular y la fagocitosis. El patrón posterior de señalización proinflamatoria y antiinflamatoria, de

citoquinas y quimiocinas expresión / secreción, y fagosoma tráfico / maduración, determina si se destruye el organismo o establece una infección a largo plazo.^[27]

Los genes involucrados incluyen el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, la resistencia natural de proteínas de macrófagos asociada (Nramp1, también denominado SLC11A1), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 10 (IL-10), el interferón γ (IFN- γ) y receptor de IFN- γ , receptores de células T, IL-6, e IL-12. Así mismo se han identificado ligandos en la superficie de las micobacterias que incluyen lipoarabinomanano (LAM), 19-kDa de lipoproteínas, y el complejo peptidoglicano-mycolyl arabinogalactano. La membrana de la célula interacciona con receptores del organismo y activan vías de señalización de la célula huésped pero no parecen alterar la expresión de gen del organismo. Sin embargo, otros receptores, incluyendo los receptores de manosa y CD14, también están implicados. Varios estudios reportan interacciones complejas entre los receptores en la promoción de la fagocitosis del organismo. Estos eventos de señalización celular preceden a la fagocitosis y por lo tanto determinan la naturaleza de la respuesta de los macrófagos antes de que el organismo entre en la célula.^[27]

Los resultados de varios estudios han puesto de manifiesto la importancia de la interacción de los receptores TLR2 de *MAP* con la membrana celular y la señalización a través de la vía MAPK p38 en la supresión de las respuestas a los antimicrobianos en los macrófagos. Aunque otras vías son, sin duda, implicados en la supervivencia de *MAP* dentro de los fagocitos mononucleares, la vía TLR2-MAPK-p38-IL-10 parece desempeñar un papel importante. Man-LAM parece ser un factor importante de virulencia implicado en la mediación de estos eventos dentro de los fagocitos mononucleares.^[27]

Por otro lado dos subpoblaciones de células T *helper* (TH1 y TH2) activan diferentes respuestas inmunitarias del huésped. Infección por *Mycobacterium paratuberculosis* parece seguir patrones observados con las infecciones por *M. leprae*, *M. bovis* o *M. tuberculosis*. Estos patrones implican una respuesta TH1 inicial (denominado <<tuberculoide>>) que se caracteriza por un infiltrado de tejido se distingue principalmente por los linfocitos con pocos o ningún organismos detectables. La respuesta TH1 también se caracteriza por la producción del interferón gamma de citoquinas (IFN- γ), una de las reacciones detectables más tempranas a la infección por *M. paratuberculosis*, además de la interleucina 2 (IL-2) y la necrosis tumoral (TNF- α). Estas citoquinas se cree que orquestan las funciones inmunes mediadas por células necesarias para contener dicha infección intracelular. Durante la etapa temprana, subclínica de la infección por *M. paratuberculosis*, la actividad de las células T TH1 parece predominar. Esta fase subclínica de la infección puede durar meses o años, ya que los bacilos se encuentran dentro de los macrófagos y los granulomas microscópicos. Debido a la memoria de las células T, se requiere una respuesta de mantener estos granulomas, controlar diseminación bacteriana y minimizar el daño tisular.^[20] Animales típicamente comienzan a exhibir los signos clínicos no específicos de la infección por *M.*

avium subsp. *paratuberculosis*, como la pérdida de peso, y en algunas especies de diarrea, ya que el animal entra en respuesta a las células TH2, o etapa lepromatosa de la infección. Las células TH2 estimulan la producción de citoquinas por coordinación de una respuesta humoral (anticuerpo) y respuesta inmune (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). La respuesta humoral no es protectora y no detiene la progresión de la infección por *M.avium* subsp. *paratuberculosis* y la patología.^[20]

Por lo tanto, se reconoce ampliamente que el desarrollo de ensayos rápidos, sensibles, específicos y para identificar animales infectados es esencial para la formulación de estrategias racionales para controlar la propagación de *MAP*.^[14]

Más tarde, investigadores de la Universidad de Minnesota concluyeron la secuencia del genoma completo de *MAP*. El análisis mostró que *MAP* K-10 tiene una única secuencia circular de 4.829.781 pares de bases, con contenido de G + C de 69,3%. El contenido de G + C es relativamente constante en todo el genoma. El análisis también reveló sólo unas pocas regiones genómicas con menor contenido de G + C correspondiente a profagos o codificación de secuencias de ARN.^[14]

En la figura 3 se muestra la secuencia completa de *MAP* K-10. Desde el interior: la flecha roja, ARNr operón; histograma de color púrpura oscuro, contenido de GC; histograma multicolor, ORFs de *MAP* codificados según la clasificación funcional (pequeña molécula de metabolismo, azul; metabolismo de macromoléculas, rojo, los procesos celulares, púrpura, otros procesos, amarillo; hipotéticos, verde, incógnitas, naranja). El histograma de color exterior indica la misma dirección de la transcripción como el origen de replicación. El histograma de color interior indica la dirección opuesta de la transcripción como el origen de replicación. Las flechas negras, representan las 45 ARNts.^[14]

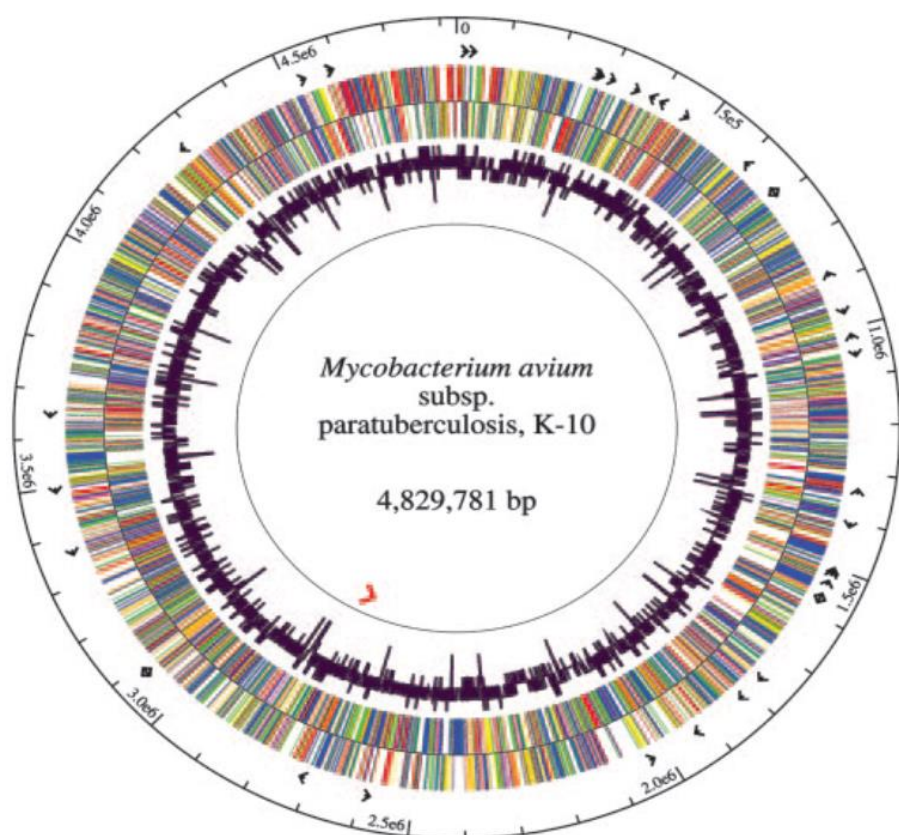


Figura 3. Representación circular del genoma completo de MAP K-10. Tomado del artículo The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Lingling Li, July 13, 2005. PNAS

En la siguiente Tabla 1 se muestra las características del genoma completo de MAP K-10.

Propiedades de MAP K-10	
Tamaño del genoma, pb	4,829,781
% Contenido de G+C	69.30
% Codificación de la proteína	91.30
Marco abierto de lectura (ORFs)	4,350
Densidad del gen, pb por gen	1,112
Promedio de la longitud del gen	1,015
ARNts	45
Operón ARNr	1

Tabla 1. Datos de la recopilación del genoma completo de MAP K-10. Adaptado a partir del artículo The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Lingling Li, July 13, 2005. PNAS.

Capítulo I.3.

Metabolismo de hierro

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP), a menudo requiere ocho a dieciséis semanas para ver colonias en cultivo, un obstáculo importante en el diagnóstico y por lo tanto en la aplicación de medidas de control óptimas. A diferencia de otras micobacterias, que movilizan hierro a través de micobactinas, MAP es incapaz de producir micobactina detectables in vitro o in vivo. Aunque las razones de la dependencia in vitro de micobactina de MAP actualmente se desconocen, se ha demostrado recientemente que el operón del promotor de micobactina (mbt) está activo y que los genes de micobactina se transcriben por MAP desde el interior de los macrófagos y en los tejidos de animales infectados de forma natural. Las micobacterias patógenas se encuentran con una amplia variedad de factores de estrés dentro de las células huésped y su capacidad para superar la privación de hierro y toxicidad de hierro representa un importante determinante de virulencia.^[29]

El hierro, el cuarto lugar entre los elementos más abundantes en la corteza de la Tierra, ocupando después el oxígeno, silicio y aluminio es rara la vez que están disponibles en forma libre debido a su muy baja solubilidad a pH neutro. Miles de millones de años atrás, durante la atmósfera anoxigénica, fermentadores anaerobios heterótrofos-utilizan el hierro como transportadores de electrones en forma de compuestos de Fe (II). Como la atmósfera progresó a tipo oxigénica, la forma oxidada de Fe (II), es decir, Fe (III) con el tiempo se incluyeron en las vías metabólicas.^[30] Ciclos de la química de hierro entre ferroso (Fe^{+2}) y férrico (Fe^{+3}) son estados que apoyan el potencial redox que es fundamental para el oxígeno y el metabolismo energético.^[37]

La cantidad del hierro que se absorbe en la dieta supone una pequeña proporción de la necesaria para el organismo, ya que la mayoría procede de la reutilización. A pesar de ello, la absorción es el principal elemento regulador de la homeostasis del hierro ya que debe adecuarse a sus reservas; esta adecuación es crítica ya que el organismo tiene unos mecanismos poco eficaces para excretar este metal. La dieta puede contener hierro orgánico (en forma hemínica) y hierro inorgánico en forma de hierro (II) y hierro (III). La mayoría del hierro de la dieta está en forma férrica formando complejos que son solubles al pH ácido del estómago, pero con una solubilidad variable al pH del intestino. Una vez absorbido y oxidado, el hierro pasa al sistema portal y luego al sistémico. De la circulación puede pasar al hígado; también puede ser atrapado por el Sistema Mononuclear Fagocítico,

que se encarga de reutilizar el hierro. Por fin, puede acceder a su destino mayoritario final, la eritropoyesis. En el plasma, el hierro puede viajar de diversas formas. Puede hacerlo en forma de complejos de baja masa molecular, que son altamente tóxicos; éstos sólo se forman en unas concentraciones apreciables en las fases avanzadas de la hemocromatosis hereditaria.^[38]

La homeostasis del hierro de los organismos ha evolucionado al parecer para mantener una concentración estable de hierro-transferrina en el plasma y el fluido extracelular. Esto requiere el control coordinado de tres flujos importantes de hierro en el compartimiento de la transferrina del plasma: la absorción de hierro desde el entorno (hierro plasma materno en el feto y hierro en la dieta intestinal después del nacimiento), el movimiento de hierro de almacenamiento en el hígado, y el reciclaje de la contenido de hierro de las células senescentes (glóbulos rojos) predominantemente por los macrófagos.

Donovan et al. (2005) proponen que el epitelio intestinal puede tomar hasta una cantidad significativa de hierro del plasma por el receptor transferrina mediada por endocitosis a través de la membrana basolateral. Si las concentraciones de hepcidina que circulan son altas, la ferroportina basolateral se degrada y el hierro es capturado. Al final de su vida útil 1-2 días, las células epiteliales intestinales cargado de hierro sería derramada en la corriente fecal. Por lo tanto, es concebible (pero aún no se ha demostrado y cuantificado) que la excreción de hierro en las heces podría ser aumentada homeostáticamente durante la sobrecarga de hierro. Este estudio importante y definitivo confirman que la exportación de hierro en los tejidos y las células no tienen otra alternativa significativa al flujo de hierro en ferroportina y proporciona apoyo adicional a la función fundamental de la interacción hepcidina -ferroportina en la homeostasis del hierro.^[37]

Los hepatocitos juegan un importante papel en el almacenamiento del hierro. En condiciones normales, la mayor parte del hierro captado por el hígado está unido a la transferrina, y esta captación puede realizarse mediante la vía receptor-dependiente o la receptor-independiente; la primera es la más importante, y probablemente el receptor de la transferrina de tipo 2 contribuye de una forma substancial en la captación de este metal. El hierro penetra en el espacio intracelular gracias al receptor específico para la transferrina; se trata de una proteína transmembrana de dos dímeros iguales de 760 aminoácidos con una masa molecular de 95 KDa, que se unen entre ellos a través de un puente disulfuro situado dentro de la membrana celular.^[38]

El hierro que se asocia con hemo representa la piscina más grande de nuestro cuerpo y es necesario para el transporte de oxígeno en la hemoglobina, en el almacenamiento de oxígeno en la mioglobina, y el transporte de electrones para la función del citocromo en la respiración aeróbica. La segunda mayor reserva de hierro está en forma de no hemo almacenado en la ferritina. Cuando es necesario, el hierro puede ser liberado de la ferritina,^[31] que es una proteína altamente conservada que se encuentra en metazoos, plantas,

eubacterias, y arqueas.^[36] La ferritina satisface las demandas para el transporte de oxígeno y el metabolismo energético. Este mecanismo limita el exceso de hierro libre que de otra manera genera especies reactivas del oxígeno (ROS). La transferrina circulante, que entrega el hierro a las células a través de la captación mediada por receptores, también proporciona una segunda agrupación de almacenamiento que es más dinámico en la naturaleza que el almacenamiento de ferritina mediante la distribución de hierro a partir de los sitios de almacenamiento (por ejemplo, el hígado) a los tejidos periféricos (por ejemplo, músculo, médula ósea, etc).^[31] Los macrófagos residentes del bazo, el hígado y la médula ósea tienen un papel central en el equilibrio de hierro de todo el cuerpo mediante el reciclaje de hierro sistémico. Estos macrófagos, conocidos colectivamente como el sistema retículo endotelial (RE), reciclado del hierro por la ingestión de eritrocitos viejos o dañados y el catabolismo de la hemoglobina para liberar el hierro. El metal liberado se almacena o bien en la célula o se exporta en el torrente sanguíneo. Cada día en el adulto humano promedio, los macrófagos del RE reciclan de 20 a 25 mg de hierro, una cantidad que es 10 a 20 veces más que el intestino que se absorbe de la dieta.^[35] En el hígado el hierro de reserva se halla mayoritariamente en forma de ferritina, mientras que en los macrófagos está en forma de hemosiderina.^[38] Sin embargo las proteínas de hierro que influyen en las enfermedades son: La hepcidina que es no sólo un jugador central en la integración del metabolismo del hierro sino que también proporciona una conexión crítica con la respuesta inmune a la infección y la inflamación; la lactoferrina, un quelante potente de hierro férrico, implicado en la modulación de la disponibilidad de hierro extracelular y la siderocalina, que también se conoce como lipocalina-2 o de neutrófilos-lipocalina asociada a la gelatinasa (Ngal), se produce por gránulos de los neutrófilos y en células epiteliales en respuesta a la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β .^[31,32] Otra proteína clave que regula la expresión de otros genes dependientes de hierro incluidos los que participan en la síntesis de sideróforos y el transporte es la proteína Fur (Ferrick uptake regulator por sus siglas en inglés),^[30] que se hablará con mayor detalle más adelante en el capítulo 5. Numerosos microorganismos patógenos secretan pequeños sideróforos orgánicos para captura de hierro. Siderocalina participa en el sistema de adquisición de hierro a través de la unión de tipo catecolato y salicilato derivado de los sideróforos cargados de hierro como enterobactina segregada por *E. coli* y micobactina secretada por *M. tuberculosis*, respectivamente. Así mismo la activación de los fagocitos via PPRs y las células Th1 de citocinas derivadas de interferón- γ produce una disminución de la expresión de receptores de transferrina y aumento de la expresión de la resistencia natural de los macrófagos asociada a la proteína-1 (Nramp1) y ferroportina.^[31,32]

Tabla 2. Proteínas de hierro clave involucrados en la respuesta inmune.

Proteína	Papel en el metabolismo de hierro	Influencia en la infección
Hepcidina	Ligando para la exportación de hierro de la proteína ferroportina; la expresión reducida altera la regulación de ferroportina en la hemocromatosis	Regula el flujo de salida del hierro de los enterocitos y macrófagos para promover Hipoferremia; activa JAK2 para modular la respuesta de citoquinas
Ferroportina	Exportador de membrana de hierro; la sobreexpresión conduce a hiperferremia en la hemocromatosis	La hemocromatosis asociada con infecciones (Vibrio, Yersinia, E. coli), pero la resistencia a patógenos intracelulares (Mycobacteria, Salmonella, Legionella)
HFE	Participación de MHC-I como molécula asociada con los TfRs	Las mutaciones en HFE se asocian con baja producción de hepcidina, y el origen genético más común de la hemocromatosis
Receptores de transferrina (TfR1 y TfR2)	Entrega de hierro unido a la transferrina a las células; sensores de nivel de hierro a través de la regulación HFE (principalmente en el hígado)	El descenso de regulación durante la infección reduce el hierro endosomal para restringir el crecimiento de patógenos (Legionella, Mycobacteria)
Lactoferrina	Presente en secreciones de unión a hierro	Liberado de los neutrófilos en los sitios de infección para secuestrar el hierro
Siderocalina (lipocalina -2 o Ng2)	Unión a catecolato y salicilato de tipo sideróforos	Liberado de los neutrófilos y los epitelios para secuestrar el hierro para limitar las infecciones
Nramp1	Transportador de metales divalentes localizado en la membrana fagosomal de macrófagos	Confiere resistencia a patógenos intrafagosomales (Mycobacteria, Leishmania, Salmonella)

Adaptado a partir del artículo: Iron metabolism and the innate immune response to infection. Erin E. Johnson a, Marianne Wessling-Resnick. Microbes and Infection 14 (2012).

El receptor de transferrina es la principal vía para la entrega de hierro a los tejidos periféricos a través de la endocitosis del ligando de la transferrina, que se une al hierro y circula en el plasma. La regulación del receptor de la transferrina limita la capacidad de la célula para adquirir hierro unido a transferrina y de forma concomitante reduce la piscina endosomal de hierro visitada por patógenos intracelulares tales como *L. pneumophila*, *M. tuberculosis*, y *Mycobacterium avium* para restringir su crecimiento. Nramp1 se identificó en ratones con una mutación que confiere susceptibilidad a las infecciones, y pérdida de la función Nramp1 en ratones se asocia con una reducción de la respuesta inflamatoria a la infección. Ciertas mutaciones en el gen humano también influyen en la respuesta a la infección y la inflamación.^[33] Nramp1 es un transportador de metales divalentes dependiente del pH que se localiza en compartimentos fagosomales y reduce el hierro intrafagosomal^[34] y el reciclaje de los macrófagos de hierro eritrofagocitado es defectuoso en ratones *knockout* Nramp1. Nramp1 funcional es conocido para conferir resistencia a los parásitos intrafagosomales como *Mycobacterias*.^[31,32]

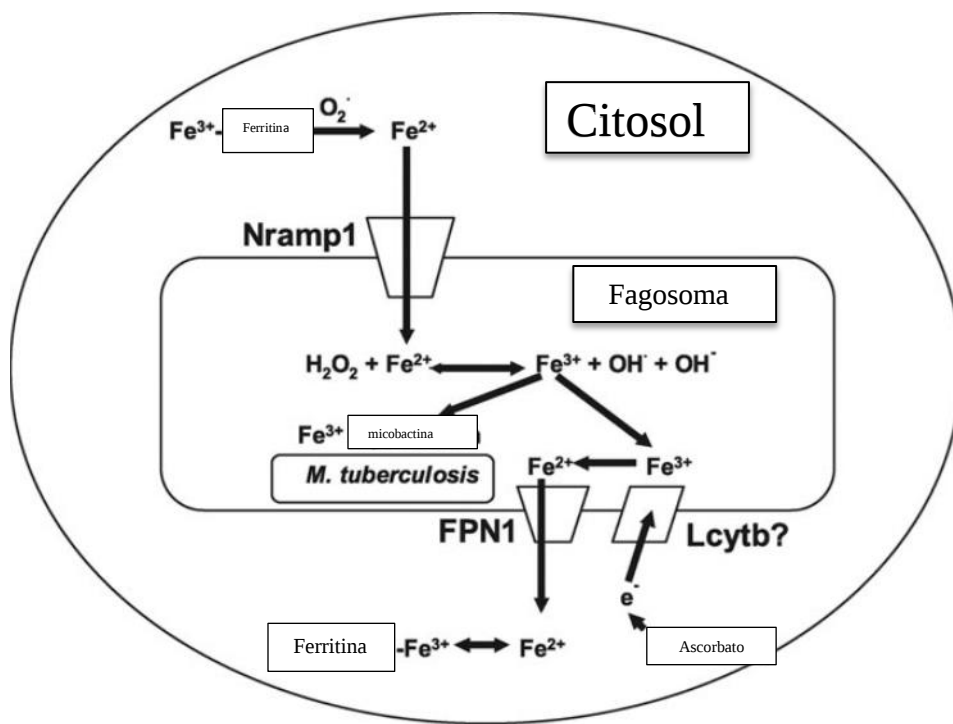


Figura 4. Modelo propuesto para la acción de FPN1 y Nramp1 en el fagosoma que contiene micobacterias. Adaptado apartir del artículo The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome Kristopher E. Van Zandt, Fatoumata B. Sow.. Journal of Leukocyte Biology. Volume 84, September 2008.

Van Zandt et al. (2008) demostraron que la proteína Nramp1 y Ferroportina actúan en conjunto para regular los niveles de hierro en el fagosoma. El Fe^{+2} es transportado a partir del hierro intracelular en el fagosoma por la proteína Nramp1, posiblemente facilitado por la liberación de Fe^{+2} a partir de ferritina a través de la acción de ROS. En el fagosoma el hierro cataliza la producción de radicales hidroxilo, resultando en la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} . Como Fe^{+3} puede ser adquirido por la *M. tuberculosis* por micobactina, el Fe^{+3} necesita ser reciclado fuera del fagosoma rápidamente. En este modelo el Fe^{+3} es reducido por la ferrireductasa asociada a la membrana fagosomal, posiblemente por Lyctb, y exportada fuera del fagosoma por FPN1 dentro del citoplasma, donde puede ser reasociada con ferritina.^[32]

La homeostasis del hierro celular asegura el suministro adecuado de hierro para las diferentes necesidades metabólicas de las células, siempre y cuando las concentraciones de hierro extracelulares se mantengan en el rango normal. El hierro circula en el plasma o el líquido extracelular en complejo con transferrina. Las células toman el complejo hierro-transferrina por el receptor transferrina mediada por endocitosis transportando el hierro a través del plasma.^[37] Por otro lado el elemento de respuesta al hierro (IRE), que es parte de un sistema bien caracterizado de control de la traducción en eucariotas, se encuentra un receptor de la transferrina (Tfr) ARNm donde hay cinco copias de la IRE situados en el 3'-UTR, y en el ARNm de la ferritina un solo IRE se encuentra en el 5'-UTR. En las células con falta de hierro los IREs son blanco de dos proteínas reguladoras del hierro citoplasmática, IRP-1 e IRP-2.^[36] Estas dos proteínas reguladoras de hierro IRP-1 e IRP-2, funcionan como sensores de hierro citoplasmáticas. Cuando el hierro celular es bajo, las IRP estabilizan el receptor de transferrina, ARNm aumentando así el número de receptores de transferrina para la absorción de hierro. IRPs deficientes de hierro también inhiben la traducción del ARNm de la ferritina, lo que permite la liberación neta de hierro de la ferritina.^[37] Las proteínas IRP-1 e IRP-2 se unen a las estructuras IRE en la región no codificada 3' del ARNm que codifica para moléculas como el receptor de la transferrina, DMT1, ferroportina 1, hephaestina y SFT, o 5' de moléculas como ferritina, 5-aminolevulinato sintasa eritrocitaria, y aconitasa mitocondrial constituyendo un mecanismo de la regulación hierro-dependiente. Además, existen mecanismos independientes del hierro basados principalmente en el aumento de la transcripción de los genes.^[38] La unión de estas proteínas resulta en la estabilización de ARNm Tfr y la inhibición de la traducción de ferritina. A la inversa, cuando el hierro es abundante, las proteínas IRPs tienden a tener menor afinidad con IRE, y, como resultado, Tfr, la degradación del ARNm así como la traducción de ferritina se estimula. Los IREs también están presentes en otros ARNm cuyos productos están relacionados con el metabolismo del hierro sistémico.^[36]

Capítulo I.4.

Factores de Transcripción

La activación y la represión de la expresión génica en bacterias es generalmente mediada por la unión de factores de transcripción (TFS) de ADN que reconocen específicamente sitios de unión TF (TFBSs) en regiones río arriba de los genes diana. Los genes y operones directamente co-regulados por la misma TF se consideran como pertenecientes a un regulón.^[39] Los metales de transición son elementos esenciales en los sistemas biológicos. Las vías metabólicas, la síntesis de ADN, la síntesis de ARN, y la síntesis de proteínas son dependientes de la disponibilidad del cofactor metálico apropiado. En apoyo de esto, todas las células han designado los productos génicos que los metales de transporte para mantener la función celular, sin embargo, ciertos metales esenciales pueden causar la formación de especies reactivas de oxígeno tóxico (ROS). Por lo tanto, las células deben firmemente regular la concentración de Fe para evitar el daño celular mediada por ROS.^[40] Los factores de transcripción (TFS) son generalmente proteínas alostéricas que se unen específicamente a sus sitios de ADN de operador, que por lo general se encuentran cerca de los promotores, ya sea en confirmación de *holo* o *apo* para regular la expresión génica. Una conformación *holo* funcional es cuando el TF se une a ADN como un complejo unido a un efector que puede ser una molécula pequeña unida de forma no covalente, o después de una modificación covalente, tal como la fosforilación por un sistema de dos componentes, mientras que se une un TF en una conformación *apo* cuando la proteína se une sola. Por ejemplo, la CRP se une a sus sitios de unión específicos una vez unidos a AMPc, su alostérico pequeño ligando, mientras que el represor Lac I se une al ADN como una proteína en la conformación *apo*, y desenlaza en presencia de alolactosa, su modificador alostérico.^[41]

La regulación transcripcional comienza con la secuencia específica de reconocimiento de elementos de ADN únicas por factores de transcripción (TFS), o bien activadores de la transcripción (TA) que se unen a secuencias de activación río arriba (UASs) o represores (TR) de unión a secuencias de represión río arriba (URSS) [42]. Múltiples vías de señalización se activan en respuesta a estímulos inmunes e inflamatorios, lo que resulta en la activación de muchos factores de transcripción diferentes. Los factores de transcripción inducidos por estimulación deben interactuar con los elementos *cis*-reguladores de los genes diana para facilitar la contratación de la maquinaria transcripcional general. El estado de la cromatina en estos elementos *cis*-juega un papel crítico en la modulación de la actividad de factores de transcripción, principalmente por que funciona como una barrera

estérica a la unión al ADN y como plataforma de regulación post-traducciona que influye en el reclutamiento de cofactores transcripcionales.^[43] Un avance importante en la comprensión de la ferroportina en el metabolismo del hierro vino en el descubrimiento de la hepcidina, producida y secretada en la circulación por el hígado, la hepcidina se une a la ferroportina (como se mencionó el capítulo anterior), en la superficie celular y causa su internalización y degradación. Esta degradación después de la traducción de la ferroportina por hepcidina, determina la cantidad de hierro que se libera en el plasma. En ausencia de la hepcidina, mecanismos celulares controlan principalmente la expresión de ferroportina. Uno de estos mecanismos incluyen la regulación post-transcripcional a través de proteínas de hierro regulatorio (IRP), que se unen a estructuras de bucle madre ARNm llamados IRE. La expresión post-transcripcional de ferritina por interacciones IRE-IRP está bien caracterizado. Los estudios que utilizan actinomicina D como inhibidor de la transcripción proporcionan apoyo para ferroportina en macrófagos que regulan la transcripción por el hierro.^[35]

La transcripción fundamentalmente puede ser entendida como la interacción de los factores de *cis* y *trans* actuando dentro del núcleo que orquestan la expresión de un gen en particular. Los elementos que actúan en *cis* se definen como elementos de ADN no codificantes situadas en el mismo cromosoma que el locus que codifica la proteína. Dos elementos *cis*-críticos son el promotor y el potenciador.

La transcripción se inicia a partir del elemento *cis*- regulador conocido como el promotor, que se puede dividir en dos porciones, el núcleo promotor y el promotor proximal. El núcleo promotor contiene elementos reguladores que se unen Pol II y la transcripción en general. Tras la detección de patógenos, el sistema inmune innato debe ser capaz de montar una respuesta contundente y rápida, pero igual de importante es la necesidad de controlar a los efectos citotóxicos de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, la modulación pro-inflamatoria de la expresión génica es de importancia fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmune. Genes pro-inflamatorias se mantienen en silencioso, sin embargo, puede ser inducida rápidamente en respuesta a diferentes estímulos, y este patrón característico se consigue a través de la acción de dos elementos: la activación de factores de transcripción inducibles y la modulación de la cromatina entorno a elementos reguladores de genes.^[43]

Las bacterias y su medio ambiente alteran la expresión de genes que promueven la supervivencia. Esto se logra por los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes ya sean beneficiosos o perjudiciales. Para adquirir Fe, las bacterias y los hongos sintetizan y secretan compuestos de bajo peso molecular, llamados sideróforos, que tienen gran afinidad por la unión a Fe +3. La mayoría de los sideróforos son producidos por la vía de síntesis de péptido no ribosomal (NRPS) y un ejemplo es el sideróforo enteroquelina. Los pasos finales de la vía se ejecutan por la acción de las proteínas Ent (codificados por el *entD*, *entF*, y los genes *entCEBA*). Aerobactina, otro sideróforo, se produce

secuencialmente por las proteínas *IucD*, *IucB*, *IucA*, y *IucC* que se expresan en el operón (*iucABCD*). Aerobactina es un ejemplo de un sideróforo no producido por la vía de NRPS. El control transcripcional de ambos sideróforos está regulada por la concentración intracelular de Fe^{+2} ; cuando el Fe^{+2} intracelular es baja, el organismo bacteriano modelo, *Escherichia coli*, induce la producción de sideróforos. Posteriormente, los sideróforos unidos a Fe son transportados en la célula para satisfacer un requisito de Fe^{+2} . Debido a que Fe^{+2} controla transcripcionalmente la expresión de productos de genes que promueven la adquisición de hierro, Fe^{+2} se prevé que sea un correpressor para una proteína de unión a ADN. Una mutación en el regulador de captura de hierro (*Fur*) codificado por el gen *fur* fue identificado en mutantes de *E. coli* que exhiben expresión constitutiva de los genes de la absorción de hierro. [43]

Fur es una proteína de unión al ADN (que se mencionará con detalle en el capítulo 5), que reconoce secuencias específicas de ADN, utiliza Fe^{+2} o Mn^{+2} como un correpressor, y bloquea la transcripción de los genes diana. Como un represor transcripcional, el homodímero *Fur-Fe*⁺² se une al sitio operador de un promotor diana. Sin embargo, *Fur* puede formar un complejo multimérico con secuencias de ADN que se extienden más allá del sitio del operador. En un enfoque elegante para definir *Fur* en genes regulados dentro de bacterias, un plásmido de alto número de copias que contiene secuencias de ADN clonados aleatoriamente de bacterias Gram positivas y negativas se transformaron en una cepa de *E. coli* que albergaba una sola copia de un reportero de fusión *fhuF :: lacZ*. [43]

Fur reprime la transcripción del gen *fhuF*, que codifica una proteína implicada en la adquisición de Fe^{+3} . *Fur* se requiere para la expresión de varias proteínas en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la superóxido dismutasa dependiente de Fe^{+2} (*SodB*). El papel de *Fur* en la regulación del ciclo TCA es un ejemplo de cómo la regulación de *Fur* es multifactorial; mutantes *fur* exhiben muchos fenotipos no sólo la expresión de sideróforos. El mecanismo molecular para la activación positiva de *fur* en el ciclo de Krebs y *SodB* fue inexplicable hasta que una publicación de referencia determina la importancia de un pequeño ARN no traducido altamente conservada (ARNs) llamado *ryhB* en la activación por *Fur*. *ryhB* se reprime directamente por *Fur* y pares de bases con los diana de ARNm, tales como *sodB* y el operón succinato deshidrogenasa *sdhCDAB*, lo que resulta en la degradación de los mRNAs reduciendo de ese modo la expresión de los productos génicos. La regulación por *ryhB* requiere la proteína chaperona de ARN; *Hfq*, la supresión de *hfq* en Δfur también restaura la expresión de muchos genes *fur* activados. homólogos *ryhB* tienen un papel en la virulencia, son reprimidos por *Fur*, y están codificados en los genomas de varios patógenos gram negativos. Regulación positiva indirecta por *Fur* a través de la regulación negativa del regulador negativo *ryhB*, es el mecanismo molecular más estudiado para la activación Fe^{+2} - dependiente de la expresión de genes, sin embargo, evidencia adicional demuestra que *Fur* podrá regular la virulencia a través del mecanismo más

complicado. Por ejemplo, en *S. typhimurium*, el factor de transcripción de virulencia *hilA* requiere Fe^{+2} a través de la regulación dependiente de Fur. ^[43]

Recientemente se ha demostrado una mayor transcripción de *hns* en Δfur y en ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina modificado (ChIP) se determinó que Fur se une a la región reguladora río arriba de *hns* de forma de metal- dependiente. H-NS se sabe que reprime la transcripción de *hilA*. H-NS es una proteína asociada con el nucleóide bacteriano y también se conoce como OsmZ, BglY, y PilG. Supresión de *fur* y el *hns* dio lugar a la activación de Fur -independiente de *hilA*, que apoya la indicación de que la regulación Fur de *hilA* fue indirecta a través de H-NS. Además, Fur no se requiere para la expresión de genes activados-Fur cuando el represor H-NS está ausente y Fur y H-NS parecen reconocer secuencias de ADN similares en todo el cromosoma bacteriano. Claramente, se puede apreciar a partir de estos ejemplos que la influencia de Fur dentro de la célula es global y típicamente implica múltiples reacciones de la regulación. Sin embargo, la evidencia reciente indica que Fur puede tener un papel más directo para la activación de la expresión génica en bacterias. ^[43]

Estudios de expresión génica han identificado genes que requieren Fur para la expresión. A diferencia de los genes reprimidos por Fur, que poseen un sitio de unión Fur el sitio se superpone a la unión RNAP y genes activados por Fur [*norB*, *pan1* (*aniA*), and *nuoA*] que contiene cajas Fur localizados ≈ 100 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, mientras que la *tbp* reprimida por Fur contiene una caja Fur que se superpone con el sitio de unión RNAP. Es importante destacar que la secuencia del sitio de la caja de la piel por genes activados es prácticamente idéntica a la caja de la piel de los genes reprimidos. En conjunto, la evidencia molecular sugiere la ubicación de la caja Fur en las proximidades del sitio de unión RNAP que determina la capacidad de Fur de activar la expresión de genes. ^[43]

En experimentos *in vitro* demuestran que la transcripción de Fur puede activar la transcripción de un gen diana a pesar de que las cajas de Fur se encuentran ≈ 100 y 200 pb río arriba del sitio de inicio transcripcional, respectivamente. Sorprendentemente, la adición de la proteína Fur para el ensayo *in vitro* de la transcripción se estimuló la producción de *hilD* ARNm, lo que sugiere la mejora de reclutamiento de RNAP al promotor de *hilD* a pesar de que la caja Fur es casi 200 pb río arriba del sitio de inicio transcripcional. Mientras que la eliminación de *fur* reduce la transcripción de *hilD* sobreexpresión de *fur* resulta un poco de incremento de *hilD* contrario a la sobreexpresión de un activador directo HilC , lo que aumenta la actividad del promotor de *HilD* por ≈ 5 veces. Estos resultados indican que el papel de Fur en la activación de la transcripción directa de un gen diana es complejo.

Activadores de la transcripción que se unen río arriba del sitio de unión RNAP, han demostrado que la interacción con el dominio C-terminal de la subunidad α (α -CTD) de RNAP, promueve la transcripción del gen diana. ^[43]

El contacto entre activadores y α -CTD se inhibe cuando el sitio de unión del activador río arriba es ≥ 100 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por lo tanto, el factor de transcripción unidos a los sitios más allá de 100 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción es poco probable que interactúen físicamente con α -CTD de RNAP. Sin embargo, la oligomerización de la proteína Fur en cajas Fur se sabe que ocurre, lo que sugiere que proteínas Fur se pueden extender para interactuar con otras proteínas cerca. Se desconoce si Fur contacta con RNAP, pero la evidencia emergente in vivo indica que hay otro mecanismo molecular plausible para la activación de Fur dependiente de ADN a través de la unión a un sitio regulador distal. ^[43]

Hay otros factores de transcripción dentro de la familia de Fur que requieren metales alternativos para el control de la regulación de genes y la virulencia. Descubierta por primera vez por el trabajo en *B. subtilis* en el laboratorio de John Helmann. PerR se encuentra ampliamente en otras bacterias y contribuye a la virulencia en patógenos. La actividad de unión al ADN de PerR es sensible a concentraciones relevantes de H_2O_2 y en los resultados de oxidación de metal-dependiente en la derepresión de los genes diana. Homodímeros PerR se detectan como dos formas, una que contiene dos iones de Zn^{+2} / Fe^{+2} por monómero y uno que contiene dos iones de Zn^{+2} / Mn^{+2} por monómero.

La familia de reguladores transcripcionales Fur controlan la virulencia de defensa contra ROS, y el transporte de Fe^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+2} . A causa de la anemia, la inflamación y la inmunidad nutricional ejercida por el huésped durante la infección, los metales están en baja cantidad en respuesta a la infección. En este entorno pobre en metales, Fur permitiría la adquisición eficiente de hierro y mejora del patógeno, sin embargo, la supresión de *fur* más a menudo resulta en la atenuación parcial o completa dentro de los modelos animales de infección.

En particular, la delección de los resultados de *fur* es en la reducción de expresión de enzimas activos responsables de la defensa contra ROS, reducción de la expresión de las rutas metabólicas clave y la reducción de la expresión de factores de virulencia. Esto significa que la contribución fundamental de Fur a la virulencia puede no ser debido a su función clásica como un represor transcripcional de la adquisición de metal sino a su complejo papel como un activador transcripcional de la virulencia. ^[43]

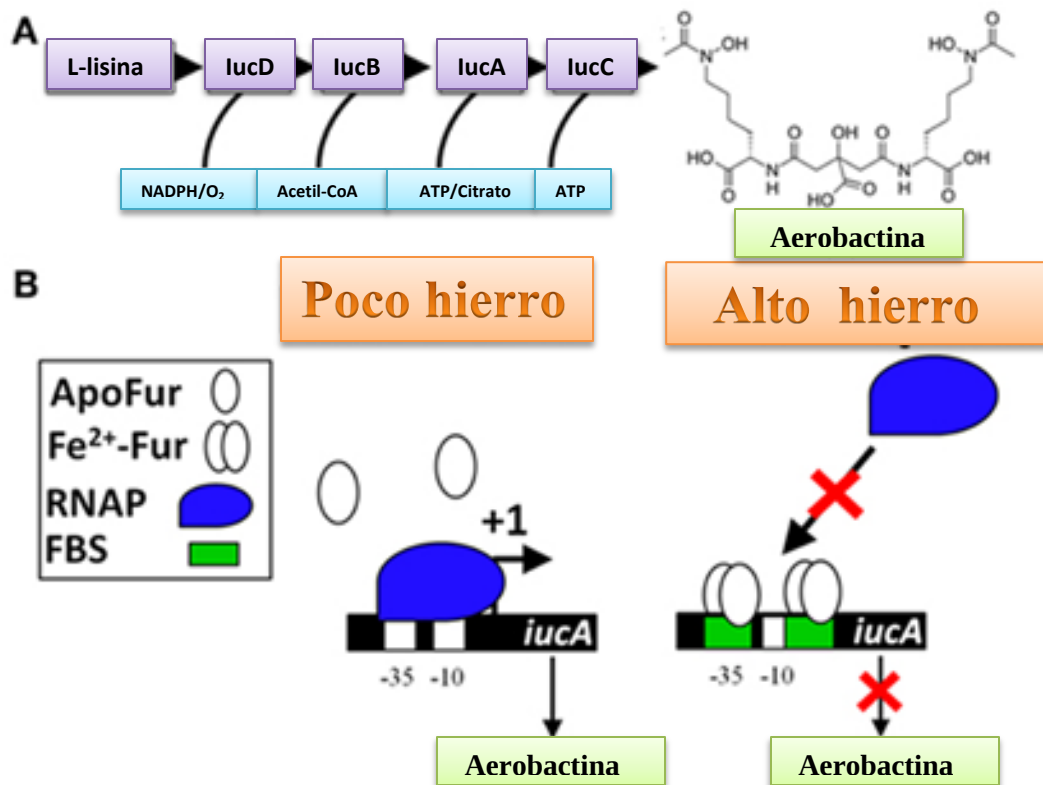


Figura 5. Modelo clásico de la represión de Fur en la adquisición de hierro. Adaptado apartir del artículo Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. Bryan Troxell and Hosni M. Hassan. Front. Cell. Infect. Microbiol, 02 October 2013.

A) La biosíntesis del sideróforo aerobactina requiere varios genes localizados en un operón (*iucABCD*, *iutA*). La expresión del gen inicial, *iucA*, es reprimida por Fur (De Lorenzo et al., 1987) y la producción de aerobactina se sabe que se produce por cepas virulentas de bacterias, especialmente cepas que causan enfermedades en huéspedes aviares (por ejemplo, el patógeno Avian de E.coli o APEC) (Lafont et al., 1987; Xiong et al., 2012; Ling et al., 2013). La actividad enzimática secuencial de lucD, lucB, lucC y lucA convierten L-Lysina en aerobactina. B) Hay dos sitios de unión a Fur (FBS) para la regulación Fe dependiente de *iucA*. Ambos FBS se encuentran dentro del promotor P1 (la superposición de los sitios -35 y los sitios -10). En condiciones de privación de Fe (panel izquierdo), hay un aumento de la transcripción (representado por un +1) de los genes cuyos productos de los genes *iucABCD* forman una ruta biosintética que produce aerobactina. En condiciones de repletas de Fe (panel derecho), Fur se une al ADN en las FBS (caja verde) y bloquea el acceso de los sitios -35 y sitios -10 por la RNA polimerasa (RNAP, forma azul).^[40]

Capítulo I. 5.

Fur

El hierro es uno de los micronutrientes más importantes para el crecimiento bacteriano y un cofactor esencial para varias proteínas que participan en importantes procesos celulares. Debido a la escasez de hierro disponible en condiciones aerobias, así como la toxicidad de hierro libre en concentraciones elevadas a través de la reacción de Fenton, bacterias emplean una serie de estrategias que permitan regular las concentraciones de hierro intracelular, tales como la síntesis y exportación de quelantes, reducción por reductasas férricas, y la expresión de genes de estrés oxidativo. En la mayoría de las especies bacterianas, la homeostasis del hierro es controlada por el regulador de la captura de hierro (Fur).^[51]

La proteína Fur (ferric uptake regulation protein) de *Mycobacterium avium* susp. *paratuberculosis* (MAP), se localiza en una isla de patogenicidad de 38 Kb^[10] y es una proteína rica en histidina.^[46] Fue nombrado así porque primero se observó que reprime la transcripción de genes que codifica para componentes de sistemas de captura de hierro (Fe^{+3}) que se encuentran en la membrana celular.^[48] Hipotéticamente se reconoce su función ya que presenta similitud en la secuencia con respecto a la de otras bacterias, su función es la de regular la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo y almacenamiento de hierro. Fur fue detectado como un regulador de transporte de hierro y la biosíntesis de sideróforos.^[47] Los sideróforos son proteínas de unión a hierro secretados por las bacterias para adquirir hierro desde el entorno.^[44] Los primeros mutantes *fur* de *E. coli* se identificaron en 1981 y mostraron expresión constitutiva de *cir*, *fhuA* y *fecA*, tres sistemas de captación de hierro que normalmente se regulan cuando el hierro disponible es bajo. Después de un año, estudios de complementación de *fur* de *E. coli*, mostraron que *fur* lleva a cabo un plásmido F' *lac* donde restauró el fenotipo silvestre de una cepa que lleva una mutación cromosómica *fur*. El gen *fur* de *E. coli* fue clonado con éxito en 1984, y la secuencia del gen se derivó poco después. Secuencias y análisis bioquímicos fueron a demostrar que Fur se conserva a través de una amplia gama de especies bacterianas y es una pequeña proteína reguladora (de 15 a 17 kDa, aproximadamente 150 aminoácidos) que funciona como un dímero que se une como cofactor al Fe (II), y es por lo general autoreguladora. Cuando el hierro está fácilmente disponible en la célula bacteriana, Fur se une al hierro y dimeriza, y el hierro unido a dímeros de Fur se une a la secuencia consenso en promotores diana. La unión de Fur en los promotores impide la unión de la ARN polimerasa, por lo tanto, se evita la transcripción del gen diana.^[44] Fur es conservada en

una amplia gama de especies bacterianas por ejemplo en gram negativas: *Yersinia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella*, *Campylobacter*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella*, *Neisseria*, *Haemophilus* y gram positivas: *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus* e incluso en cianobacterias^[46] y en plantas infectadas con algún patógeno.^[44] La mayoría de estos homólogos son capaces de complementar un mutante de *fur* de *E. coli*, lo que sugiere que los mecanismos moleculares que controlan la regulación transcripcional por el hierro son compartidos por muchos microorganismos. La proteína Fur es capaz de multimerizar a través de interacciones proteína-proteína.^[45] Fur además regula los genes de la respuesta al estrés oxidativo, el metabolismo del hierro, y los determinantes de virulencia de las bacterias patógenas.^[46] La gran variedad de genes controlados por este regulador se ha puesto de manifiesto mediante el uso de técnicas genéticas y bioquímicas ingeniosas. Por ejemplo, ensayos de titulación Fur; FURTA (por sus siglas en inglés Fur titration assays) permite la detección de promotores regulados por hierro a partir de una biblioteca de plásmidos. Este método se basa en un regulador de hierro cromosomal regulado por la fusión de *lacZ* al gen *fhuF*. Esta fusión es excepcionalmente sensible a pequeños cambios en la concentración de hierro debido a la débil afinidad del promotor *fhuF* al complejo de represión Fur-Fe⁺².^[45] Los promotores de los genes reprimidos por Fur contienen una o dos secuencias de ADN diana llamados cajas de hierro, donde se presentan diversos grados de similitud con el consenso palindrómico de 19 pb de la secuencia 5'-GATAATGATAATCATTATC-3'. Este motivo se conserva entre las bacterias, y se ha demostrado que Fur de *Escherichia coli* interactúa con sitios operadores de Fur presentes en los genes diana de otras especies bacterianas.^[46] Una característica común entre las cajas Fur es el alto número de nucleótidos de A / T respecto a los nucleótidos C / G.^[44] Adicionalmente en ensayos in vivo mostraron que esta secuencia, clonado río abajo de un promotor heterólogo, fue suficiente para asegurar que su actividad transcripcional fue regulada por el hierro.^[44] La inspección de los genes que se encuentran regulados por Fur ha revelado que esta proteína participa también en funciones que no están directamente relacionados con el metabolismo del hierro. Estos incluyen los procesos celulares tan variados como la defensa contra los radicales de oxígeno, la quimiotaxis, vías metabólicas, bioluminiscencia y la producción de toxinas y otros factores de virulencia.^[45, 50] Experimentos han demostrado que Fur se une al ADN en presencia de Zn⁺², Mn⁺², Co⁺², Cu⁺², Cd⁺²,^[48] Ni⁺²,^[49] Mg⁺² o Mo⁺².^[59] Estudios recientes han sugerido que Fur purificado contiene por lo menos un ión Zn⁺² como estabilizador estructural. Se ha observado que Fur se une al ADN como un dímero y en polímeros de orden superior, y en microscopía electrónica se ha demostrado polimerización de Fur en el ADN bajo altas concentraciones de proteínas y de iones metálicos.^[48]

Fur posee tres dominios funcionales, la unión al ADN de dominio hélice-giro-hélice, el dominio de dimerización de la proteína-proteína, y el dominio de iones sensibles al metal. El último dominio es esencial para la dimerización de Fur para formar una proteína funcional. Ya se ha sugerido por Pohl et al. que se requiere la hélice N-terminal para la

unión eficiente del ADN a la caja de Fur. ^[56] El extremo C terminal está implicado en la dimerización, mientras que el extremo N-terminal representa la capacidad del represor de unirse al ADN. ^[45] Por lo general, los miembros de esta súper familia de proteínas Fur, se reconocen por el motivo HHHXHX₂CX₂C rico en histidina situado en el comienzo del dominio de dimerización, después de una región bisagra presente entre el dominio de unión al ADN y el C-terminal. ^[59]

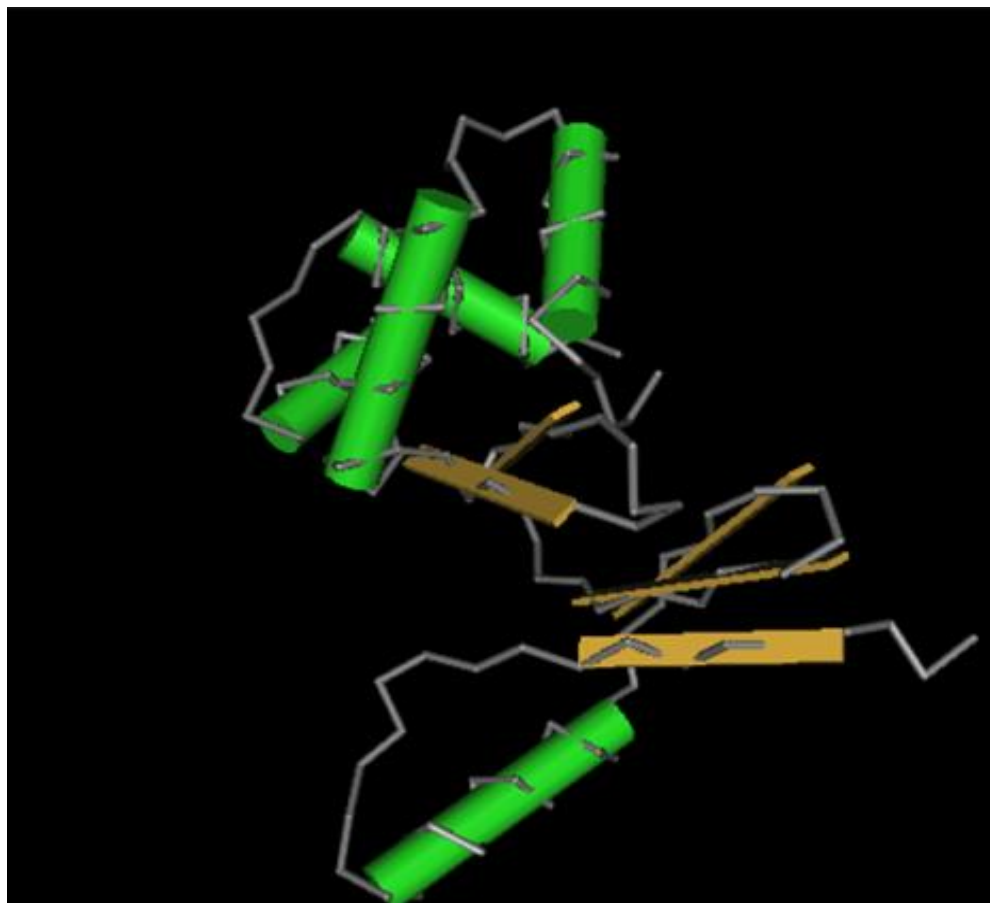


Figura 6. Estructura tridimensional de la proteína Fur.

Marchler-Bauer A et al. (2013), "CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure." *Nucleic Acids Res.* 41(D1):D384-52

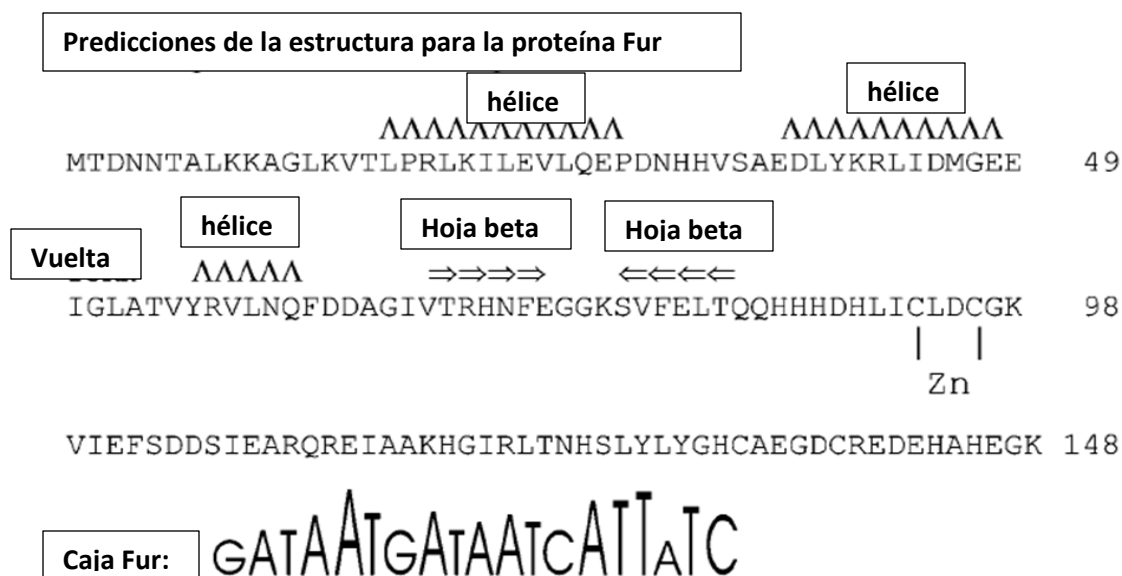


Figura 7. Estructura de las predicciones para la proteína Fur y el sitio de unión a Zn.

Adaptado a partir del artículo J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2002) 4(3): 217–222. Klaus Hantke.

Como Fur de *E. coli* es uno de los más estudiados, se han hecho numerosas publicaciones detallando la regulación de fur de sistemas de captación de hierro en este organismo modelo. Estos incluyen el sistema citrato férrico de transporte (*fecABCDE*), el receptor de ferricromo-hierro (*fhuA*), el receptor de colicina I (*cir*), el regulador del operón *fecABCDE* (*fecIR*), el receptor de ferrienterochelin (*fepA*), el gen de la absorción de iones férrico (*fiu*), la aerobactina (*iucA*) operón, y los operones divergentes del ferrienterochelin enterobactina esterasa receptor-férrico (*fepA-fes*).^[44]

No sólo Fur está involucrado en la regulación de la homeostasis del hierro, también está directamente implicado en la colonización y virulencia.^[44] Debido a que Fur requiere Fe^{+2} como corepresor la disponibilidad de este metal controla la actividad de Fur. En muchos patógenos bacterianos la defensa contra ROS requiere de la proteína Fur. El complejo de Fe^{+2} - Fur se inactiva por ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), ambos de los cuales son generados por el huésped durante la infección. Los humanos y otros eucariotas superiores producen numerosas proteínas que secuestran Fe^{+2} y hemo para privar a los patógenos de hierro y mientras tanto prevenir la formación tóxica de ROS.

Además, Fur parece ser una proteína abundante. Watnick et al. encontraron en *Vibrio* alrededor de 2.500 moléculas de Fur por célula durante la fase logarítmica, que aumentó a 7.500 moléculas en la etapa estacionaria.^[45] Zheng et al. encontraron en *E.coli* que hay aproximadamente 5.000 moléculas de Fur por célula en crecimiento exponencial en cultivos de *E. coli*, y aproximadamente 10.000 moléculas de Fur por célula después del estrés oxidativo.^[52] Por otro lado las proteínas de la familia fur están en todas las procariotas. Actualmente, cerca de 10.000 secuencias pertenecientes a 4.091 bacterias y

arqueas diferentes se recopilan en la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF01475>).^[60]



Figura 8. Procesos celulares regulados por Fur. Adaptado a partir del artículo The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. Fillat MF. Arch Biochem Biophys. 2014 Mar 15.

Como se ha mencionado, la regulación de Fur implica la unión de los dímeros de Fur con hierro a la región promotora de los genes diana para excluir el sitio de unión de ARN polimerasa, sin embargo, los estudios recientes han demostrado casos en que Fur funciona como un activador o como un represor de hierro.^[44]

En algunos organismos Fur también puede actuar como un regulador positivo en el control de la expresión génica.^[50]

Otro mecanismo de supervivencia en el que Fur se ha encontrado para desempeñar un papel en la patogénesis es contra el estrés oxidativo a través de la regulación de los genes, como catalasa (*kat*) y superóxido dismutasa (*sod*), que ayudan a combatir los productos de oxígeno tóxicos. El gen de la catalasa (*kat*), que codifica la enzima catalasa, está regulada

por Fur. Fur reprime *katG*, una combinación de catalasa-peroxidasa, tanto en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*, y esta regulación es universal en todas las especies de *Mycobacterium*. También de interés para este organismo es la regulación de Fur del gen *mntH*, un gen que codifica un homólogo de mamífero de Nramp1. Otro gen de supervivencia oxidativo que está comúnmente regulada por Fur es la superóxido dismutasa (sod). Superóxido dismutasa se clasifican en función de su cofactor metálico: sodA, sodB y sodC utilizan Mn (II), Fe (II) y Cu (II) o Zn (II), respectivamente. El tipo de Sod varía con el tipo de especies bacterianas. ^[44]

P.aeruginosa	18	LPRVKILQMLdsaeqr	MSAEDVYKALmea-geDV	GLATVYRVLTQFEAA	GLVVRHNF	DgghaVF	ELAdsg	HMV	95	
MAP	15	KQR-TVLEVLraq-en	RSQAQQLYQDIRnqql	RIGLTSVYRILRALAADRIAETQRAE	edgeiLYRLR	teag	HRHYLLCR		92	
V.cholerae	17	LPRLKILEVLqqpecq	HSAAEELYKKLidl-geE	IGLATVYRVLTNQFDDA	GIVTRHHF	EggksVF	ELStq-h	HLV	94	
Sulfurovum sp.	17	FQRMNILEViek--hg	MSVDDIYAEVikv-hp	SLATITTKNITLMQEN	GILVEVPI	AgkksKY	ELAK--i	MMHL	91	
G.sulfurreducens	22	RQRDIILDAFlst-dr	HLSTIEELYLKLrak-hp	NI	GYATVYRTIKLFAES	GIAEMQF	GdggtRY	EHVtege	HLV	99
M.xanthus	43	RQRSLIIDTFfav-gg	LSVEELWNKVreq-dt	KVSVATVYRTMKLLSEC	GLAHARNF	GdggtRY	EAAagrd	MMHL	120	
A.cellulolyticus	14	RQKRALAQVmaes-rq	ERSAQELHEALidr-ge	SVGLTTVYNQLRAMAEA	GLVDTLRAP	dgetLY	RQCetna	MMHL	91	
G.bemidjiensis	24	LQRNLVVDAMvel-gr	THVDELYLLrak-yp	YIGHATVYRSRLLAES	GLAREIYLG	gitRY	ELArqge	MMYLV	101	
C.tetani	16	KGRRNILYILsdn-kd	ATAEYIHHKLiiek-ni	NI	DLSTVYRNLELFNKE	GIIIDKFDV	GdkyNY	LINpd-k	MMHLE	92
B.bacteriovorus	42	SQRMALIKALheg-rr	HVTAQELYEKLnke-np	DI	GFATVYRFLRTLTEG	TFVTEVRM	GglpaRY	ELTpk-g	MMHL	118
P.aeruginosa	96	LTGEVILFMdaei	KKRQKEIvr-er	GFELV	HNLVLYVRK				134	
MAP	93	QCGRAVAFtpydi	EEHTRRLsr-qh	HYADv	THYVDLYGTC				131	
V.cholerae	95	DCGEVILFSddvi	KKRQKEIaa-ky	NVQLt	HSLYLYGKC				133	
Sulfurovum sp.	92	ECGEVERMNCmts	DKIFHEltekeH	KLd	RQVNLYGVC				131	
G.sulfurreducens	100	CCGAIILFEnaie	KLQDDVaa-ah	DVIT	HKLELYGLC				138	
M. xanthus	121	RCGTIILFEnerie	ALQDAVar-kh	GKVt	HKMELYGLC				159	
A.cellulolyticus	92	YCGRTEVVKgisv	ERWAERVaa-ra	GFVDv	HTLEVVGTC				130	
G.bemidjiensis	102	DCGTVTEFEnssv	KKQLRLah-nl	CFAIE	LKIELKGLC				140	
C. tetani	93	ICHKEIILDcp-ik	OLEQIIksrtg	ETIEe	LDIKIKGLC				131	
B.bacteriovorus	119	KCGKICFEnkaie	GLQEKVan-qf	CFKLE	HILELYGVC				157	

Figura 9. Alineamiento de la proteína MAP3773c de MAP con otras especies de bacterias. La región amarilla indica los sitios de unión al ADN, la región verde indica los sitios de unión al hierro, la región azul indica los sitios de unión al zinc, la región rosa, indica los sitios de unión a otras proteínas, incluyendo los aminoácidos 94 y 124.

Marchler-Bauer A et al. (2013), "CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure.", **Nucleic Acids Res.** 41(D1):D384-52.

Capítulo I.6.

Vacunas

La historia del uso de la vacunación para el control de la enfermedad de la paratuberculosis, data desde 1926, cuando Vallee y Rinjard informaron el uso del bacilo de la paratuberculosis en directo con adyuvante en aceite de oliva, parafina y piedra pómez en polvo. ^[4] La vacunación es considerada como una de las intervenciones de salud pública que ha tenido el mayor impacto en la salud mundial, la enfermedad infecciosa aún sigue siendo la principal causa de muerte en el mundo y las vacunas en uso hoy en día representan sólo la punta del iceberg cuando se considera el número de enfermedades que necesitan ser dirigidas. Como resultado de las revoluciones tecnológicas y paradigmas cambiantes, se ha entrado en un renacimiento en el desarrollo de vacunas en el que es posible la rápida identificación selectiva de nuevos antígenos de vacunas a través de gran escala genómica de alto rendimiento, transcriptómica y análisis proteómicos. Sin embargo, las vacunas más exitosas se han desarrollado utilizando los métodos convencionales que siguen el paradigma establecido por Pasteur hace más de un siglo, es decir, "aislar, inactivar, e inyectar" el microorganismo causante de la enfermedad. Por lo tanto, la mayoría de las vacunas consisten de microorganismos enteros (ya sea muerto o vivo atenuado) o subunidades purificadas de un microorganismo, y sólo un pequeño número se basan en antígenos producidos de forma recombinante. Además, las vacunas disponibles se dirigen principalmente a microorganismos que tienen poco o nada de la diversidad antigénica y para el cual la vacunación induce inmunidad de protección mediada por anticuerpos. ^[53]

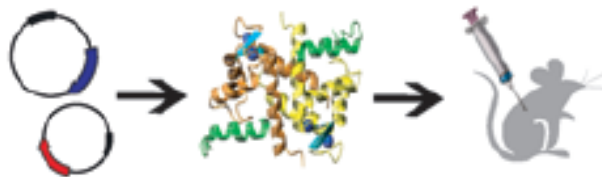


Figura 10. Desarrollo pre-clínico que se expresa en *E. coli*, y utilizado para inmunizar ratones. Imagen tomado a partir del artículo Vaccinology in the genome era. C. Daniela Rinaudo, John L. Telford, Rino Rappuoli, and Kate L. Seib. The Journal of Clinical Investigation Volume 119 Number 9 September 2009

Vacunas para *MAP* son una importante herramienta utilizada en el control de la enfermedad de Johne en los animales. Tienen ventajas sobre la gestión del rebaño y las estrategias de sacrificio, más fácil de implementar en una amplia escala y menos dependiente de las pruebas de diagnóstico. Es claro, sin embargo, que aunque puede ser capaz de prevenir a la mayoría de los animales la aparición de la enfermedad clínica, sus formulaciones actuales proporcionan una protección incompleta contra la infección y desprendimiento, en su defecto por lo tanto para erradicar el organismo ^[54]. Desde esta perspectiva, es necesario explotar simultáneamente los tres principales enfoques clásicos para erradicar o reducir el impacto de la paratuberculosis en rebaños o manadas. Estos son: 1) introducir los cambios de gestión para disminuir la transmisión de *MAP*, 2) aplicar prácticas de prueba y de desecho para eliminar las fuentes de infección, 3) vacunar a los sustitutos con el fin de aumentar su resistencia a la infección. En las granjas o en fincas animales infectados con *MAP*, excretan entre 10.000 y 10 millones de bacterias por gramo de *MAP* a través del estiércol. ^[57]

En el perfil de transcripción de *Mycobacterium tuberculosis* durante el curso temprano de la tuberculosis en ratones inmunocompetentes BALB / c y SCID, reveló un conjunto de 67 genes activados exclusivamente en los pulmones de ratones inmunocompetentes BALB / c, proporcionando una visión de la respuesta bacteriana al sistema inmune del hospedero. Para la mayoría de los patógenos bacterianos, proteínas capaces de provocar una respuesta inmune protectora, se secretan o bien proteínas o proteínas expuestas en la superficie, y estos representan los candidatos más prometedores de vacunas. ^[53]

La mayoría de las preparaciones de vacunas de células enteras actuales confían en los subcultivos de las cepas clásicas que se generaron hace más de 70 años, y algunas evidencias sugieren que, los tipos de cepa virulentos recientemente adquiridos pueden ser más eficaces. ^[54]

Las micobacterias son inmunógenos potentes, inducen tanto anticuerpos como respuestas inmunes mediadas por células. El bacilo de Calmette-Guérin (BCG), una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, es la vacuna más ampliamente utilizada en todo el mundo; *Mycobacterium tuberculosis* se utiliza rutinariamente para la preparación de adyuvante completo de Freund; y componentes de la pared celular de micobacterias han sido explotados en el desarrollo de sistemas adyuvantes alternativos. Con la llegada de las herramientas para la manipulación genética de micobacterias, varios informes han descrito el uso de BCG recombinante como un vector de vacuna potencial. ^[24] De hecho BCG parece proporcionar cierta protección en ratones contra la infección de *MAP* y esta protección incrementa cuando BCG expresa un grupo de genes a partir de una isla de patogenicidad putativa de *MAP*. ^[4]

La vacunación, como medida de control de la paratuberculosis, es probablemente la estrategia menos aceptada aunque es o ha sido utilizado en todos los países con problemas

importantes con esta enfermedad. Es una estrategia altamente costo-eficiente, lo que impide claramente la aparición de casos clínicos, si se hace correctamente. Además, otro factor muy importante en la propagación de la paratuberculosis, lo que complica el control de esta enfermedad a través de las medidas de gestión, es la capacidad de *MAP* para sobrevivir en el ambiente durante alrededor de un año.^[57]

Una vacuna que reduce la tasa de infección o eliminación fecal del organismo sería de enorme valor en los programas de control de la paratuberculosis si se pudiera reducir la prevalencia de la enfermedad.^[58]

Debido a que *Fur* es un regulador global que controla los genes relacionados con la captura de hierro y otros metales divalentes, esta puede ser un blanco importante para crear vacunas. La proteína *Fur* regula no sólo los genes relacionados con la captación de hierro, sino también los genes importantes para la virulencia.^[56] Estudios recientes muestran la incorporación de una mutación en el gen *fur* en SPI2 de *Salmonella* que se centra en el diseño de vacunas vivas atenuadas que sería seguro para la vacunación en ratones inmunodeficientes y al mismo tiempo ser lo suficientemente inmunogénica para conferir protección contra la infección por *Salmonella*.^[55] Mutantes del gen *fur* de *Salmonella* han sido atenuados en mamíferos cuando son administrados oral o intraperitonealmente pero no son muy inmunogénicos. También se ha evaluado mutantes de *fur* de *Edwardsiella ictaluri* donde fueron atenuados en peces administrados por inmersión o por vía oral, y conferían protección inmune, desencadenando respuestas inmunes sistémicas y cutáneas.^[56]

Para que la vacunación sea exitosa en el control de la paratuberculosis es necesario proteger al animal siendo joven, especialmente en el primer año de vida. Las medidas de gestión se centran principalmente en evitar el contacto entre los animales jóvenes infectados y susceptibles. Si bien existe una evidencia limitada en cuanto a la respuesta inmune protectora necesaria contra la paratuberculosis, parece que estos están predominantemente mediada por células. En contraste, las respuestas de anticuerpos es muy poco probable que jueguen un papel significativo en la protección inmune contra la paratuberculosis. Así mismo los anticuerpos de la madre en el calostro no va a proteger a su descendencia, debido a esto es necesario el desarrollo de un programa de vacunación para la paratuberculosis. El programa de vacunación dependerá del proceso de la enfermedad de la paratuberculosis, uso del sistema del hospedero y las características de la vacuna. El mecanismo de los efectos terapéuticos de la vacunación de la paratuberculosis se desconoce y podría ser debido a la estimulación de la respuesta inmune adaptativa y la respuesta inmune celular.^[4]

II. JUSTIFICACION

En MAP aún no se reconoce la función de MAP3773c así como tampoco se conoce el mecanismo de metabolismo de hierro, no hay vacunas eficaces y los tratamientos no son efectivos.

III. HIPOTESIS

MAP3773c se expresa y puede ser inmunogenica

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Elaborar una construcción que contenga el marco abierto de lectura para MAP3773c de *MAP* y su expresión para uso como vacuna.

IV.2. Objetivos específicos

- Construir un plásmido de clonación TOPO que contenga el marco abierto de lectura para MAP3773c de MAP
- Construir un plásmido de expresión en E.coil pRSET-A que contenga MAP3773c.
- Expresar la proteína MAP3773c, por inducción de IPTG.
- Evaluar la seroreactividad de la proteína MAP3773c contra suero de conejo y sueros positivos de ovinos infectados con MAP.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Diseño de Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados diseñados con extremos en la región 5 prima para *SacI* y *HindIII* respectivamente, se diseñaron con el programa Primer express, usando la secuencia reportada en el Gen Bank MAP3773c que son los siguientes sentidos:

Forward: 5'GAGCTCGTGTTCATCGCCCGCTGCG 3',

Reverse: 5' AAACCTTTCACGGTTGTGTGTTTTG 3',

V.2. Cultivo bacteriano.

Se utilizó el cultivo bacteriano *MAP* ATCC 19698

V.3. ADN de *MAP*.

V.3.1 Amplificación del gen MAP3773c por PCR.

La amplificación se llevó a cabo siguiendo las condiciones de reacción de acuerdo a la Tabla 4 y las condiciones de temperatura de acuerdo a la Tabla 5. Se realizó un atenuado de bacterias de *MAP*, las cuales en un principio fueron lavadas con agua y atenuadas 15 minutos a ebullición y esa mezcla sirvió como templado para iniciar la reacción de amplificación, en un Termociclador Eppendorf.

V. 4 Clonación del gen MAP3773c en TOPO pCR2.1.

La clonación se llevó a cabo con el kit de TOPO® Cloning pCR2.1, de Invitrogen. De la reacción fresca de PCR en la que se amplificó el gen de MAP3773c, se tomaron 3 µL de producto de PCR, se incorporaron en un tubo de 0.5 mL, se agregaron 1 µL de solución de sales, 1 µL de vector TOPO y 0.5 µL de agua. La mezcla se incubó de 22–23°C, durante 5 minutos y posteriormente se almacenó a -20°C hasta su uso. La reacción se utilizó para realizar la transformación en células competentes de *E. coli* DH5α, de la siguiente forma: Se puso cultivo de 10 mL y se midió su absorbancia hasta 0.4 a 600nm, las células se incorporaron en tubos y se centrifugaron, se les retiró el medio de cultivo, se les agregó 3ml de CaCl₂ 50 mM, se dispensaron las células en microtubos centrifugando por 5 minutos a 7000 rpm, a 4°C se decantó el sobrenadante y se les añadió 1ml de CaCl₂ 50 mM, se centrifugó 5 minutos a 7000 rpm, posteriormente se decantaron y se agregó un nuevo volumen de CaCl₂ 50 mM, resuspendiendo el pellet y dejando las células incubando en hielo por 30 minutos.

Después de este tiempo se centrifugaron las células por 5 minutos a 5000 rpm se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 100µl de CaCl₂ 50 mM, se agregó 4µl de los plásmidos ligados de TOPO,pCR 2.1-MAP3773c, se dejó reposar en hielo por 10 minutos e inmediatamente se trasladó a baño María por 2 minutos a 42 °C, después de este tiempo se dejaron por 10 segundos en hielo y se agregó 900 µl de medio Luria Bertani LB Broth MILLER EMD Millipore para recuperación de las células, se incubaron por 1 hora a 37° C. Posteriormente se tomaron 100 µl de cada tubo y se plateo en cajas con medio LB solido con ampicilina 50 µg/ml y 40 µl de IPTG 2mM en cada caja y se dejaron incubando a 37 °C durante toda la noche. Al siguiente día se seleccionaron las clonas por PCR, de acuerdo a las condiciones de volumen y de reacción de las Tablas 4 y 5.

V.5. Clonación del gen MAP3773c en pRSET-A.

V.5.1. Digestión de inserto y vector con enzimas de restricción *Sac I* y *Hind III* de New England Biolabs.

Las reacciones de digestión se llevaron a cabo utilizando las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII* de New England Biolabs. Posteriormente las clonas pRSET-A y TOPO-MAP3773c fueron digeridas con *Sac I* y *HindIII* en las siguientes condiciones: *Sac I* 1µl, *HindIII* 1µl, Buffer NEB 2.1 10X de New England Biolabs 2µl y DNA 16µl con incubación de 1 hora con 30 minutos a 37 °C.

V.5.2. Reacción de purificación del fragmento MAP3773c y pRSET

El método utilizado para la reacción de purificación fue el de QIAquick Gel Extraction Kit Protocol de QIAGEN, USA.

La reacción de digestión se corrió en electroforesis utilizando gel de agarosa al 1.5% de Sigma por 45 minutos a 100 volts. Después se cortaron las bandas pRSET y MAP3773c del gel de agarosa y posteriormente se colocaron en microtubos. Se les agrego buffer QG a cada tubo hasta llenar el tubo eppendorf. Se incubaron los tubos a 50 °C en baño maria durante 10 minutos. Se mezcló en vortex y se agregó 700 µl de alcohol isopropílico. Se pasaron a tubos con columna y se centrifugaron por 1 minuto a 13,000 rpm. Posteriormente se adiciono 750µl de buffer PE y se centrifugo 1 minuto a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se prosiguió a centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm. Posteriormente se transfirió la columna a un microtubo nuevo de 1.5 ml, se agregó elution buffer y se dejó reposar por 5 minutos. Se centrifugo de 2 a 3 veces el mismo sobrenadante en la columna, esto para asegurar que mi DNA fue extraído por completo.

V.5.3. Ligación con MAP3773c y pRSET.

Después de la reacción de purificación se les realizó reacción de ligación. La reacción de ligación se llevó a cabo con el reactivo T4 DNA Ligase de New England BioLabs. Posteriormente se realizó la ligación a las siguientes condiciones:

pRSET 4µl

MAP3773c 14µl

Buffer de ligación 1µl

Ligasa 1µl

Se dejó a temperatura de 16 °C por toda la noche.

V.5.4. Transformación genética con *E. coli*.

La transformación con los plásmidos se realizó con células competentes de la cepa *E. coli* DH5α TOP10F.

Tabla 3. Genotipo de la cepa TOP10F.

Nombre de la cepa	Genotipo
TOP10F	F' {lacIq, Tn10(TetR)} mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lac 74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

Se puso cultivo joven y se midió su absorbancia hasta 0.4 a 600nm, enseguida se pusieron en hielo junto con el CaCl₂ 50 mM, se dispensaron las células en microtubos centrifugando por 5 minutos a 7000 rpm, se decantó y se añadió 1ml de CaCl₂ 50 mM, se centrifugó 5 minutos a 7000 rpm, posteriormente se decantó y se agregó de nuevo CaCl₂ 50 mM, resuspendiendo el pellet dejando las células incubando en hielo por 30 minutos.

Después de este tiempo se centrifugaron las células por 5 minutos a 5000 rpm se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 100µl de CaCl₂ 50 mM, se agregó 4µl de mis plásmidos ligados con pRSET y MAP3773c utilizando un control positivo, se dejó reposar en hielo por 10 minutos e inmediatamente se trasladó a baño maria por 2 minutos a 42 °C, después de este tiempo se dejaron por 10 segundos en hielo y se agregó 900 µl de medio Luria Bertani LB Broth MILLER EMD Millipore y se dejó reposar incubando por 1 hora a 37° C

Posteriormente se tomaron 100 µl de cada dilución y se plateo en cajas con medio LB solido con 25 µl de ampicilina y 40 µl de IPTG 2mM en cada caja y se dejaron incubando a 37 °C durante toda la noche.

Después de la obtención de las clonas pRSET - MAP3773c en las cajas con medio LB solido se seleccionaron 20 clonas para hacerles reacción de PCR a las condiciones como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Condiciones de PCR para MAP3773c

Reactivos	Cantidades (1 reacción)	Cantidades (20 reacciones)
dNTP'S	1.5 µl	30 µl
Buffer 10X	2.5 µl	50 µl
Oligonucleotido R	2.5 µl	50 µl
Oligonucleotido F	2.5 µl	50 µl
DMSO	1.25 µl	25 µl
Agua esteril	12.25 µl	245 µl
Taq polimerasa	0.5 µl	10 µl
ADN	2 µl	40 µl

Las condiciones de temperatura para MAP3773c en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron las siguientes:

Tabla 5. Condiciones de temperatura de PCR para MAP3773c.

Temperatura	Tiempo estimado
94 °C	10 minutos
94 °C	30 minutos
63 °C	30 minutos
72 °C	30 minutos
72 °C	10 minutos

Todas las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 25µl, utilizando como control positivo el plásmido TOPO- MAP3773c y como control negativo agua estéril exclusivo para biología molecular de SIGMA. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. De esas 20 transformantes salieron positivas a MAP3773c las clonas 1, 2 y 10.

V.5.5. Extracción de plásmido.

De las clonas que resultaron positivas se les realizo la extracción de los plásmidos utilizando el kit Plasmid mini extraction Accuprep, de Bioneer corporation in Korea. Se cultivaron las clonas en 40ml de medio Luria Bertani (LB) LB Broth MILLER, EMD Millipore, USA, suplementado con 50mg/ml de ampicilina, se incubaron durante toda la noche. Se centrifugaron las células y se decantó el sobrenadante, al pellet se le agrego 250

μl de buffer 1, se sometió en vortex hasta que el pellet se disolvió por completo, posteriormente se agregó 250 μl de buffer 2, mezclando por inversión de 3 a 4 veces suavemente, evitando el vortex. Enseguida se añadió 350 μl de buffer 3 mezclando por inversión de 3 a 4 veces suavemente, evitando el vortex. Se prosiguió centrifugando por 10 minutos a 13,000 rpm y el lisado claro se pasó a tubos con columna que viene incluido en el kit y se centrifugo por 1 minuto a 13,000 rpm. Posteriormente se añadió 700 μl de buffer 4 y se centrifuga por 1 minuto a 13000 rpm. La columna se transfirió a un microtubo y se agregaron 50 μl de agua estéril de Sigma Aldrich, USA, incubando por 5 minutos, se centrifugo 1 minuto a 13,000 rpm, enseguida se tomaron los 50 μl de plásmido y se volvió a colocar en la columna para centrifugarlo de nuevo, este paso se repitió de 3 a 5 veces para obtener una mayor concentración de plásmido.

V.5.6. Digestión de inserto y vector con enzimas de restricción *Sac I* y *Hind III* de New England Biolabs, USA.

Se extrajeron los plásmidos de estas clonas para digerirlas con enzimas de restricción *Sac I* y *HindIII* a las siguientes condiciones:

Tabla 6. Condiciones de restricción con enzimas *SacI* y *HindIII*

Reactivos	Volumen (μl)	Reactivos	Volumen (μl)	Reactivos
<i>Sac I</i>	1	<i>Sac I</i>	1	<i>Sac I</i>
<i>Hind III</i>	1	<i>Hind III</i>	1	<i>Hind III</i>
Buffer 10X	5	Buffer 10X	5	Buffer 10X
Agua esteril	33	Agua esteril	33	Agua esteril
TOPO-MAP3773c (control)	10	pRSET – hsp70 (control)	10	Clona 1
TOTAL	50		50	

Tabla 7. Condiciones de restricción con enzimas *SacI* y *HindIII*

Reactivos	Volumen (μl)	Reactivos
<i>Sac I</i>	1	<i>Sac I</i>
<i>Hind III</i>	1	<i>Hind III</i>
Buffer 10X	5	Buffer 10X
Agua estéril	33	Agua estéril
Clona 2	10	Clona 10
TOTAL	50	

V.6. Transformación genética con *E. coli*. para pRSET- MAP3773c en las cepas BL21, BL21(DE3) Y BL21(DE)pLysS

Posteriormente se realizó transformación con las cepas, BL21, BL21 (DE3) pLysS y BL21 (DE3), cultivando las clonas en medio LB más antibiótico para inducir las con IPTG 2mM y expresar la proteína.

Tabla 8. Genotipos de las cepas BL21, BL21(DE3) Y BL21(DE)pLysS

Nombre de la cepa	Genotipo
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)
BL21	fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS

Se preparó cultivo joven y se midió su absorbancia hasta 0.4 a 600 nm, enseguida se colocaron en hielo junto con el CaCl₂ 50mM, se dispensaron las células en tubos eppendorf centrifugando por 5 minutos a 7000 rpm, se decantó y se agregó 1ml de CaCl₂ 50mM, se centrifugo 5 minutos a 7000 rpm, posteriormente se decantó y se agregó de nuevo CaCl₂ 50mM resuspendiendo el pellet dejando las células incubando en hielo por 30 minutos.

Después de este tiempo se centrifugaron las células por 5 minutos a 5000 rpm se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 100 µl de CaCl₂ 50mM y se agregaron 4 µl de los plásmidos pRSET - MAP3773c utilizando un control positivo, se dejan en hielo por 10 minutos e inmediatamente se trasladaron a baño maria por 2 minutos a 42 grados centígrados, después de este tiempo se dejaron por 10 segundos en hielo y se agregó 900 µl de medio Luria Bertani LB Broth MILLER EMD Millipore posteriormente se sometió a incubación por 1 hora a 37 °C.

Posteriormente se tomaron 100 µl de cada dilución y se plateó en medio LB sólido con 25µl de ampicilina y 40 µl de IPTG 2mM y se dejó incubar a 37 °C durante toda la noche.

V.6.1. Extracción de plásmido.

La extracción de los plásmidos se realizó de igual forma utilizando el kit Plasmid mini extraction Accuprep, de Bioneer corporation (Korea).

V.6.2. Expresión de la proteína.

La expresión de MAP3773c se llevó a cabo con la inducción con IPTG 2 mM en la cepa BL21(DE3) seleccionando la clona pRSET- MAP3773c 10, posterior a eso se determinó la

presencia de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de coomasie.

Se realizó un gel de poliacrilamida en gradiente al 4%, 8% y 12% en cámara chica en las siguientes condiciones como se muestra en la Tabla no. 9 y Tabla no. 10

Tabla 9. Método para el gel separador:

REACTIVOS	CANTIDADES		
	12 %	8%	4%
Solución de monómeros	2.40 ml	1.60 ml	0.80 ml
Tris 1.5 M, pH 8.8	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
SDS 10%	0.12 ml	0.12 ml	0.12 ml
Agua bidestilada	2.00 ml	2.80 ml	3.60 ml
Persulfato de amonio 10%	0.045 ml	0.045 ml	0.045 ml
TEMED	0.003 ml	0.003 ml	0.003 ml

Tabla 10. Método para el gel concentrador:

REACTIVOS	CANTIDADES
Solución de monómeros	0.33 ml
Tris 0.5 M, pH 6.8	0.50 ml
SDS 10%	0.04 ml
Agua bidestilada	1.22 ml
Persulfato de amonio 10%	0.025 ml
TEMED	0.002 ml

V.7. Inmunización de conejo y ratón BALB/c.

V.7.1. Inmunogenicidad con MAP3773c.

Se sometieron a inmunización animales de laboratorio, un conejo y tres ratones de la cepa BALB/c.

De las clonas positivas a pRSET – MAP3773c en la cepa BL21 (DE3), se sometieron a animales de laboratorio utilizando un conejo y 3 ratones de la cepa BALB/c, siguiendo el siguiente protocolo de inmunización:

Tabla 11. Protocolo de inmunización de antígenos particulados.

Inyección no.	Tiempo (día)	Dosis	Vía
1	0	0.5 ml	IV
2	4	1.0 ml	IV
3	8	2.0 ml	IV
4	12	3.0 ml	IV
Sangrado	18		

V.7.2. Western Blotting.

Posteriormente se realizó inmunoelectrotransferencia de las proteínas expresadas en BL21 (DE3), lo cual se seleccionó la clona 10 para transferir.

Una vez que la electroforesis de poliacrilamida terminó, se transfirieron las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa mediante la preparación de un sándwich constituido por papel de filtro, gel y la membrana. Para manejo de la membrana se utilizó guantes para no dejar huellas sobre el mismo.

Se colocó el papel en un recipiente apropiado que tenga unos 200 ml de regulador de transferencia.

Se cortaron cuatro pedazos de papel filtro del tamaño del “cassette”.

Se tomó el “cassette” del equipo de electrotransferencia y se colocó la esponja humedecida en regulador de transferencia sobre el mismo. Sobre la esponja se colocó un pedazo de papel filtro humedecido y sobre este la membrana de nitrocelulosa.

Se colocó sobre esta membrana el gel cuidando que no queden burbujas atrapadas entre el gel y la membrana. Después se puso dos pedazos de papel filtro humedecido sobre el gel. Enseguida se puso la otra parte del “cassette” y se cerró quedando como sándwich. El sándwich se sumergió en buffer de transferencia, se conectó a la fuente de poder y se aplicó 300 mV durante 2 horas.

Al término de la transferencia se desconectó el aparato y se extrajo el “cassette” para recuperar la membrana de nitrocelulosa y posteriormente se realizó western blot.

La membrana de nitrocelulosa, se colocó con mucho cuidado, tomándola de una orilla en un recipiente con regulador de bloqueo al 5% dejándose incubar por 1 hora a 37 °C

Posteriormente se desechó el regulador de bloqueo, se lavó 10 veces con PBS-TWEEN y se sumergió la membrana con el primer anticuerpo utilizando sueros de borrego: 178, 175, 9G4 y 9M17 diluidos cada uno con PBS-T-Leche: 100 µl de cada suero más 400 µl de PBS-T-L y se dejó incubar por 1 hora a 37 grados centígrados.

Después se lavó con PBS-T 10 veces y se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de borrego diluido 1:1000, 2.5 µl con 2,500 µl de PBS-T-L y de esta dilución se tomaron 500 µl a cada tira y se incubó a 37 °C por 1 hora. Enseguida se lavó 10 veces con PBS-TWEEN y se le agregó el sustrato dejándolo incubar durante 15 minutos.

V.7.3. Antisueros de ratón y conejo

Los antisueros utilizados para el ensayo de Western Blotting fueron los reactivos Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate de BIORAD y Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate de BIORAD (USA).

V.7.4. Anticuerpos Anti-His.

Los anticuerpos utilizados en el ensayo para comprobar la presencia de la proteína MAP3773c fue el reactivo His tag Recombinant Rabbit Oligoclonal Antibody de Life Technologies (India).

VI. RESULTADOS

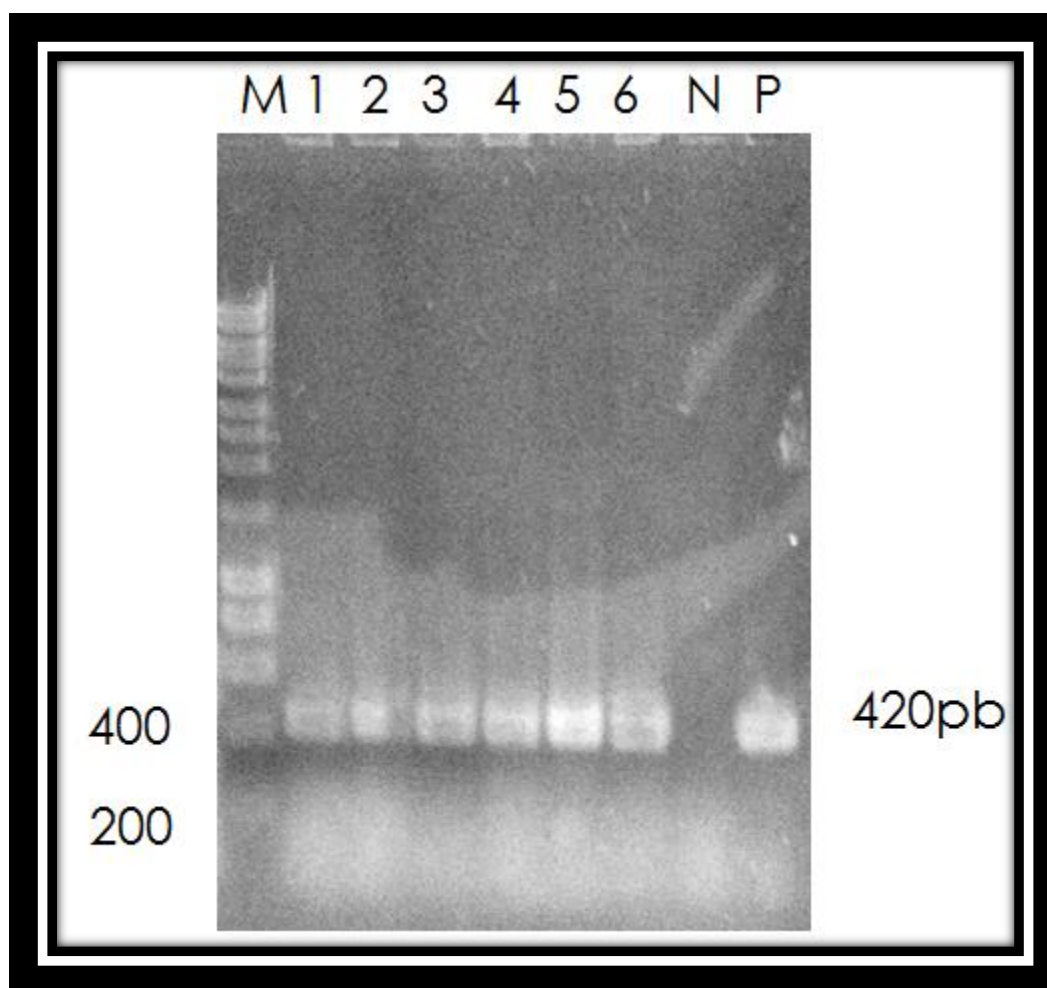


Figura 11. Construcción de TOPO- MAP3773c. Verificación del tamaño correcto (420pb) de inserto MAP3773c de 6 clonas del constructo TOPO-MAP3773c. Carriles del 1 al 6 clonas de TOPO- MAP3773c , M, marcador de peso molecular, N, control negativo y P, control positivo de ADN de MAP ATCC19698.

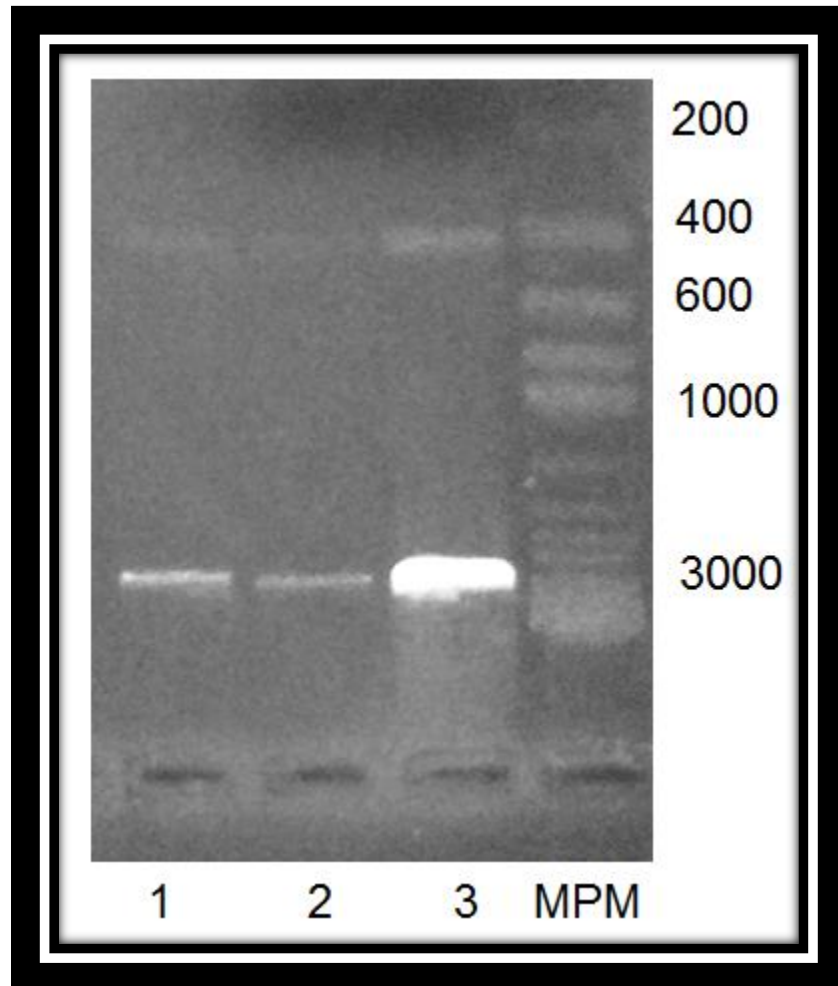


Figura 12. Plásmido TOPO- MAP3773c digerido con enzimas *SacI* y *HindIII*, se muestra el fragmento de 420 pb, en los carriles 1,2 y 3 MPM, marcador de peso molecular.

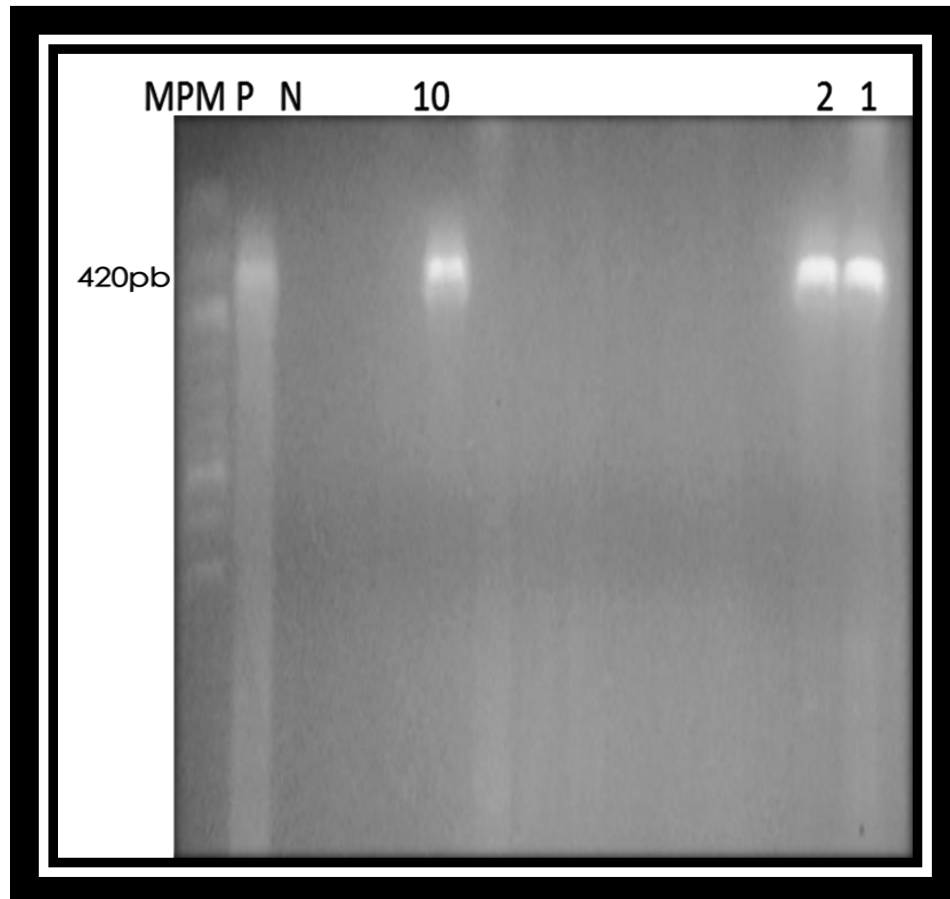


Figura 13. Clonas 1, 2 y 10 positivas a MAP3773c. Las clonas positivas a MAP3773c fueron las clonas 1, 2, y 10, en gel de agarosa al 1.5%. Se utilizó MPM de 100 pb.

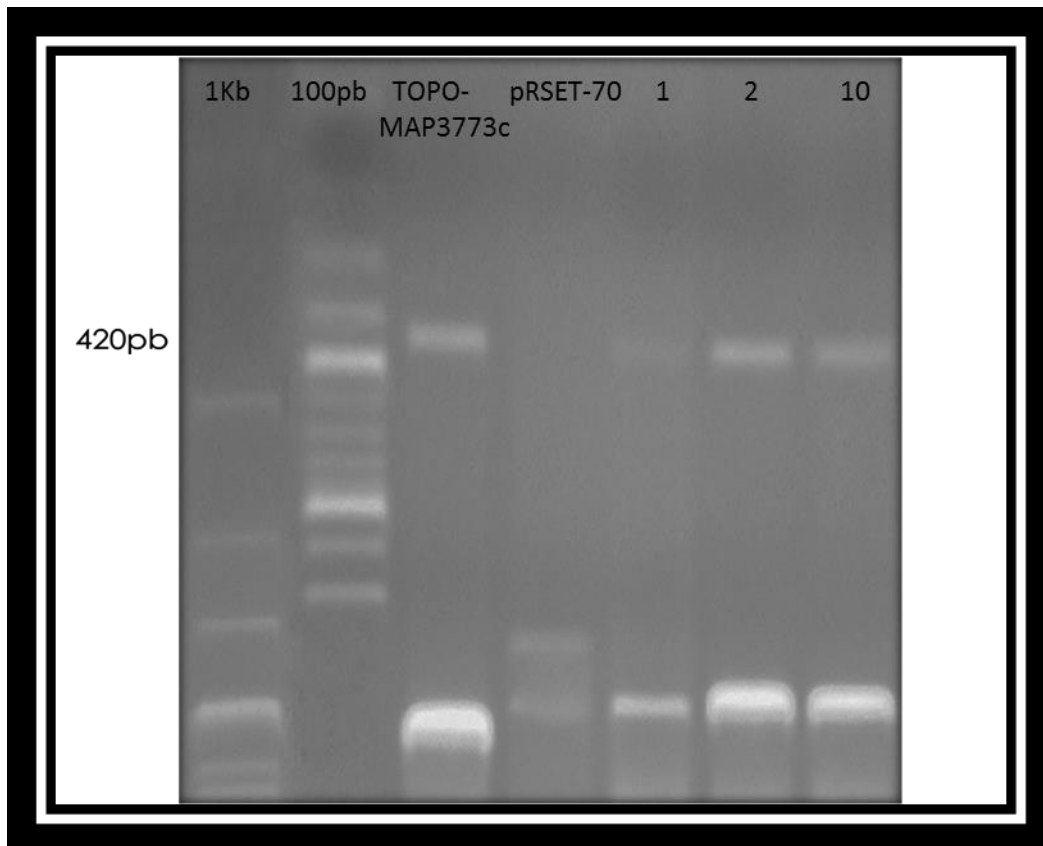


Figura 14. Digestión de pRSET - MAP3773c con enzimas *Sac I* y *HindIII* de las clonas 1, 2, y 10. Se utilizó MPM de 1Kb y otro de 100 pb, y como controles TOPO- MAP3773c, y pRSET -70. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%.

Expresión de la proteína MAP3773c

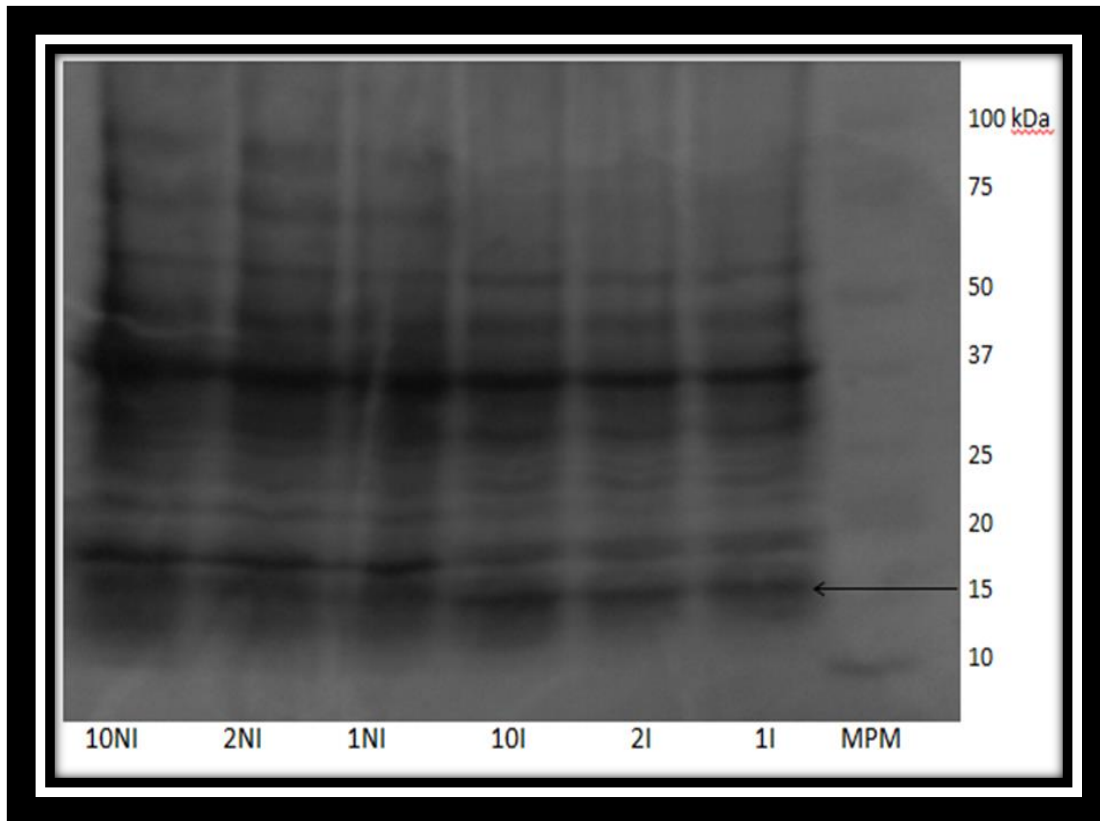


Figura 15. Expresión de la proteína MAP3773c en BL21 (DE3) en la clona 10. Gel hecho en gradiente en 4%, 8% y 12%.

NI: No inducida

I: Inducida

MPM: Marcador de peso molecular

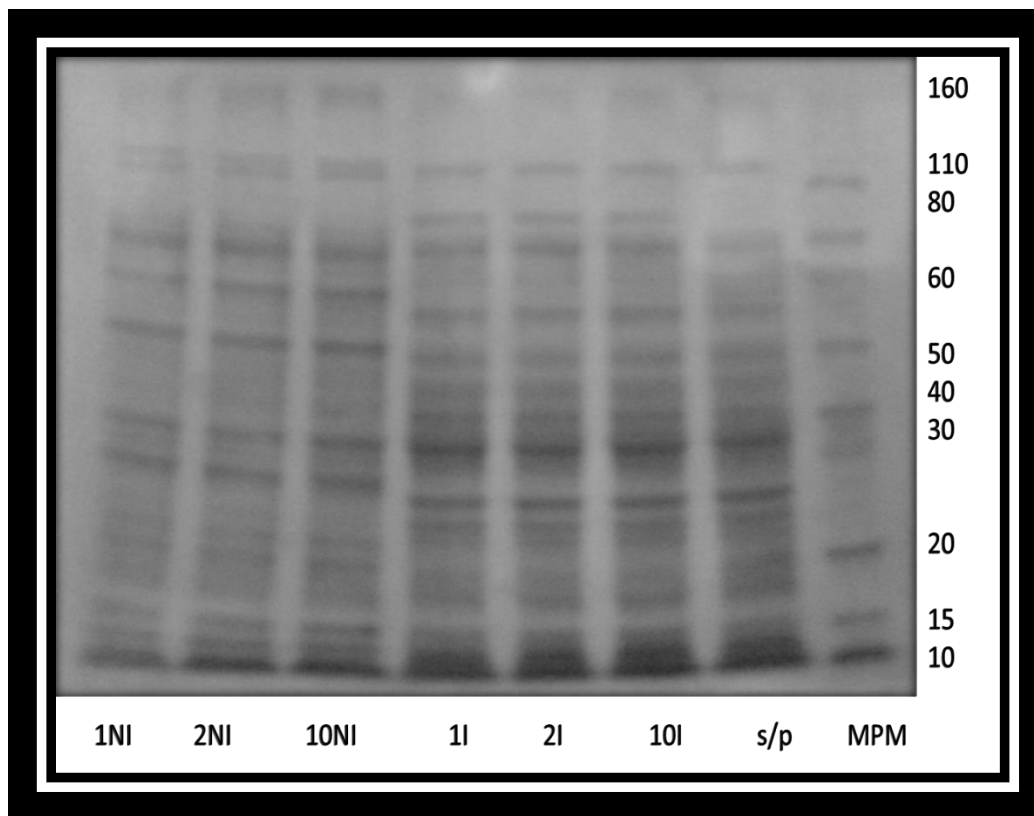


Figura 16. Expresión de la proteína MAP3773c en la cepa BL21 (DE3) utilizando la clona 10. En este gel no se observa con claridad la proteína. El gel en donde se corrió fue un gel de una concentración de 7% de la compañía BIORAD.

NI: No inducida

I: Inducida

s/p: Sin plásmido

MPM: Marcador de peso molecular

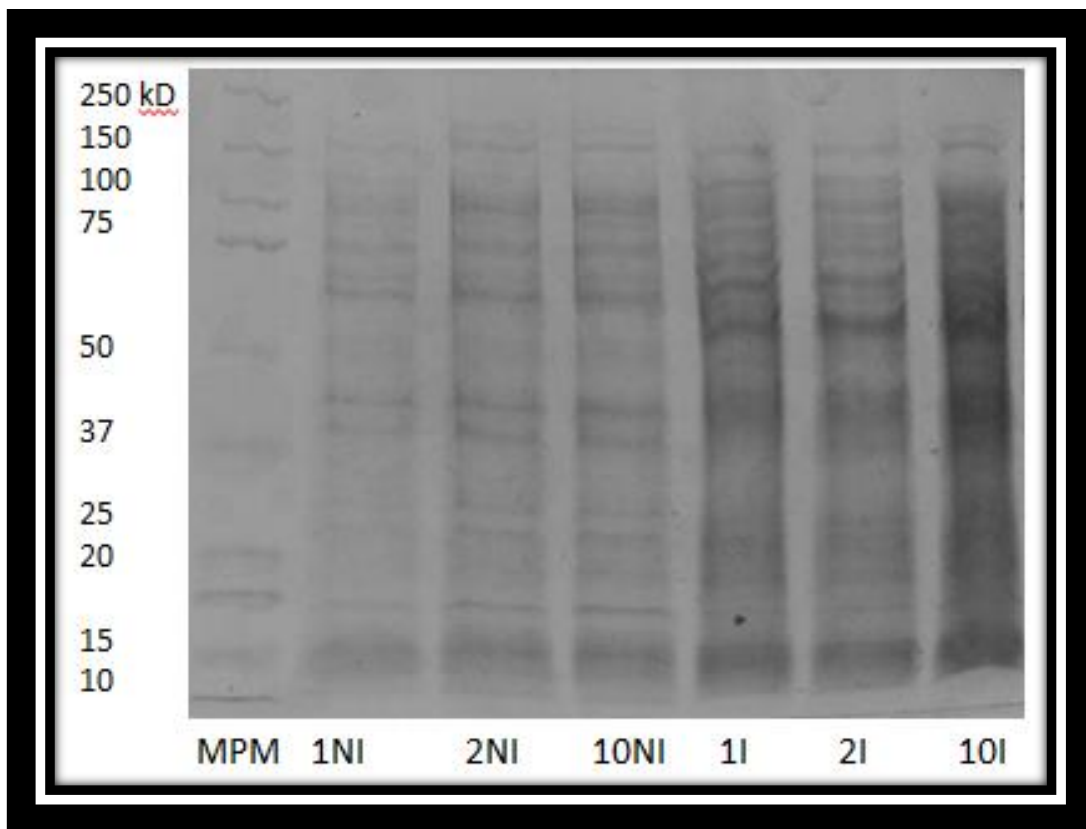


Figura 17. Clonas 1, 2 y 10 en BL21 (DE3) pLysS. En este caso no se observó la presencia de la proteína en BL21 (DE3) pLysS. Se utilizó gel en gradiente al 4%, 8% y 12%.

NI: No inducida

I: Inducida

MPM: Marcador de peso molecular

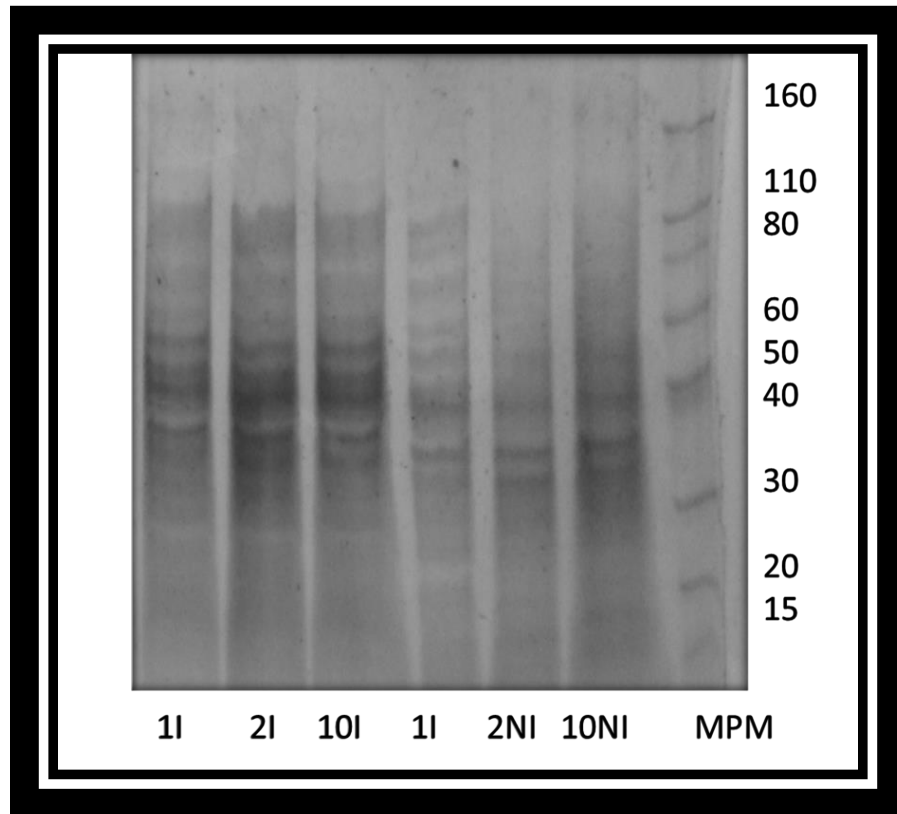


Figura 18. Clonas 1, 2 y 10 en la cepa BL21. No se observó la presencia de la proteína en las clonas 1,2 y 10 en la cepa BL21. Se utilizó gel en gradiente al 4%, 8% y 12%.

NI: No inducida

I: Inducida

MPM: Marcador de peso molecular

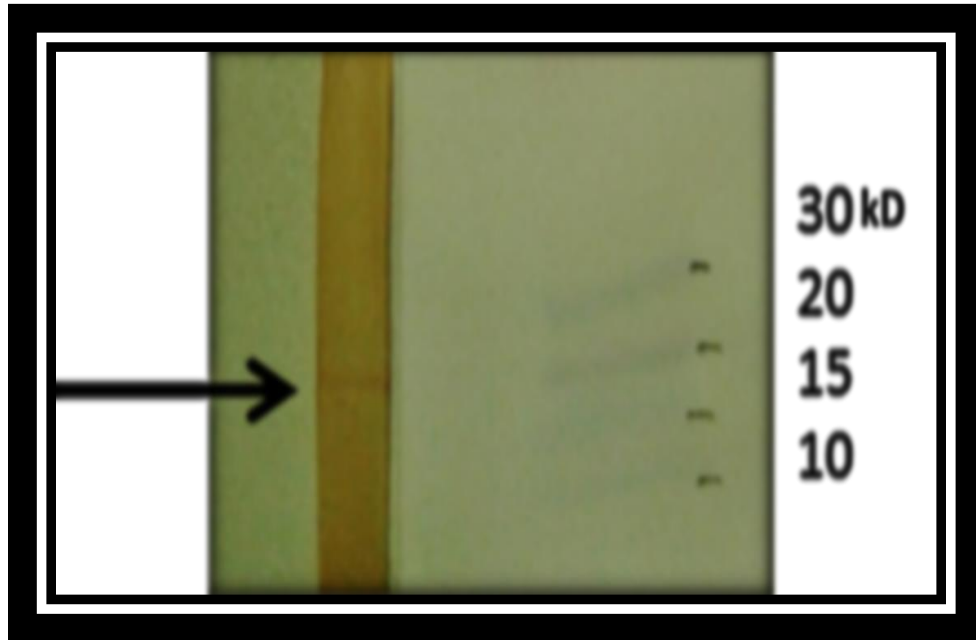


Figura 19. Verificación de la expresión del pRSETA-MAP3773c -6His en E-coli mediante anticuerpo anti-his. Se observa una banda de aproximadamente 18 kDa en la membrana transferida con la cepa BL21 (DE3) utilizando la clona 10.

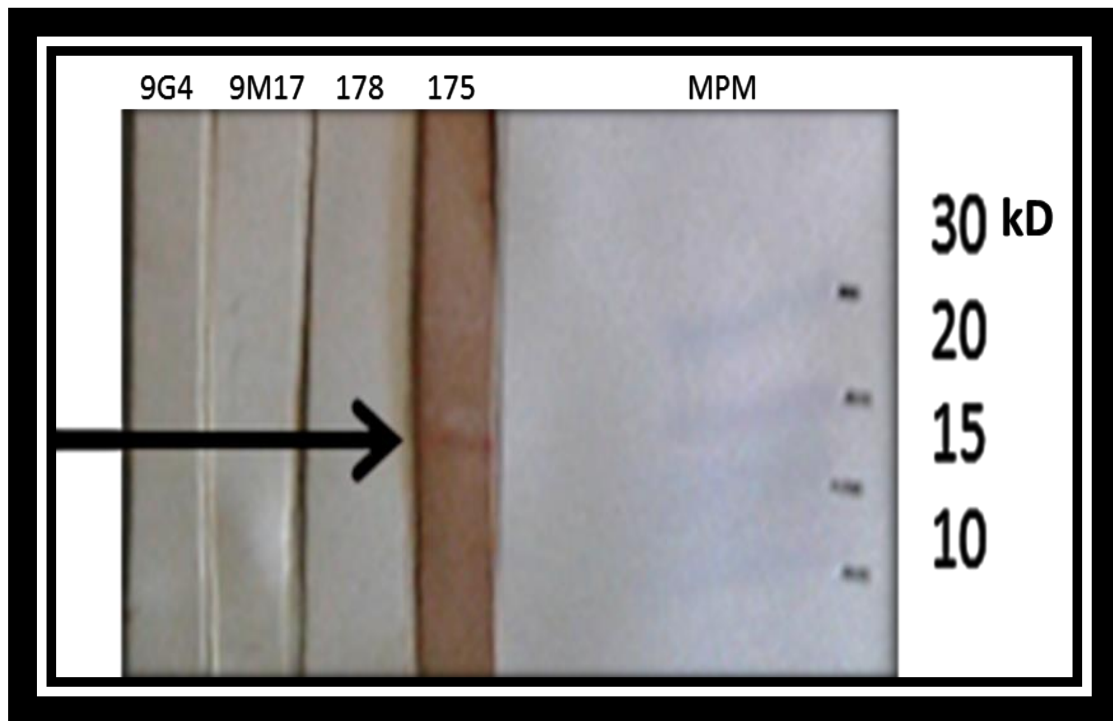


Figura 20. Seroreactividad de MAP3773c recombinante con sueros de borregos infectados con MAP. Se observa que el suero no. 175 fue reactivo mientras que los sueros 9G4, 9M17 Y 178, resultaron no reactivos al ensayo de Western blotting.

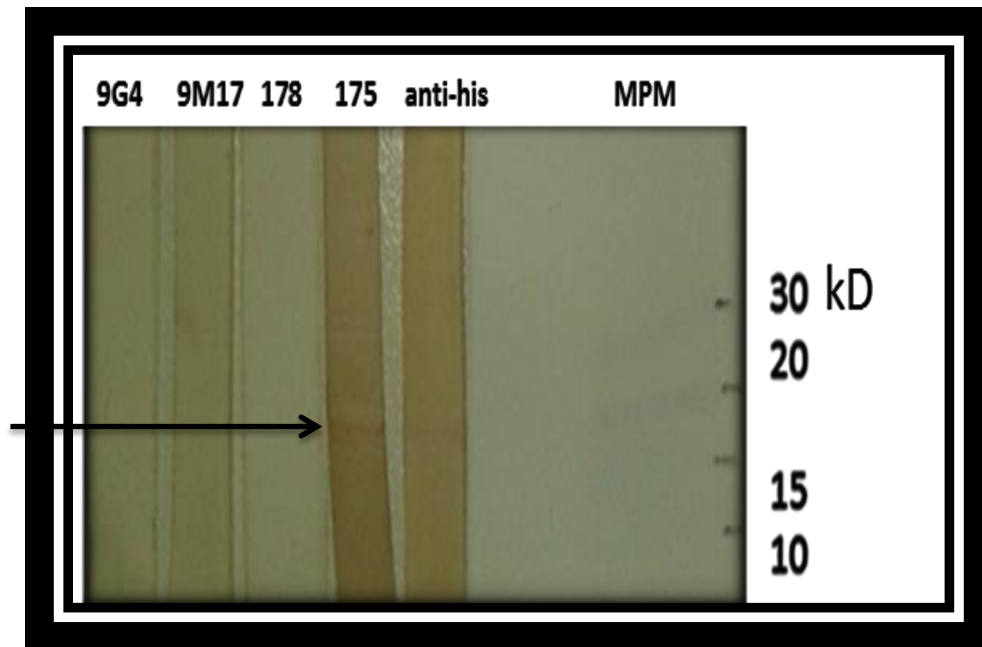


Figura 21. Presencia de la proteína con el anticuerpo anti-his tag y seroreactividad con los sueros de borrego. Los sueros de ovino 9G4, 9M17, 178 resultaron no reactivas al contrario del suero 175 resultando reactivo.

Conejo

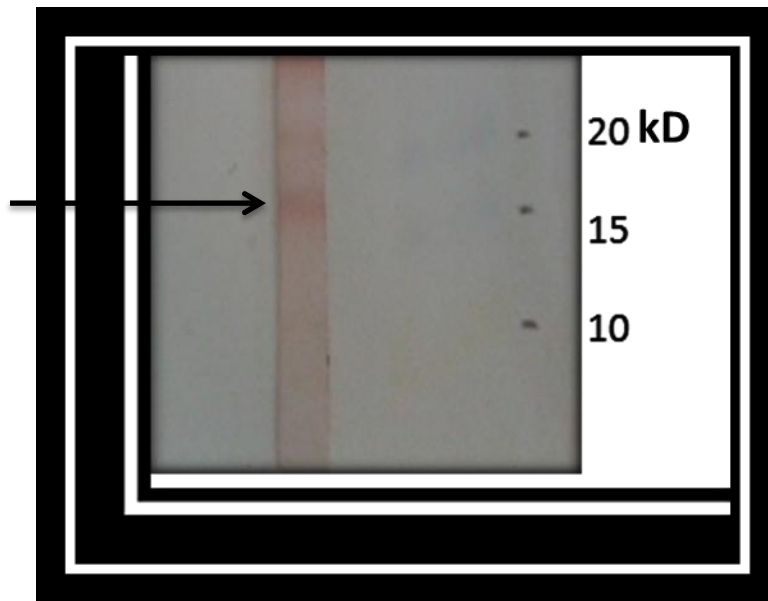


Figura 22. Inmunogenicidad con suero de conejo inmunizado con extractos completos de E.coli BL21(DE3). Se observa una banda de aproximadamente 15 kDa.

Ratón

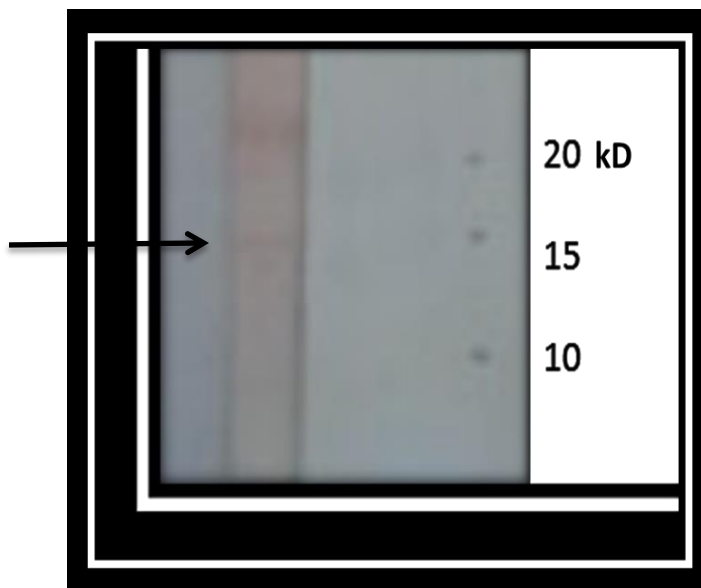


Figura 23. Inmunogenicidad con suero de ratón BALB/c, observándose una banda tenue de aproximadamente 15 kDa.

De acuerdo a los resultados presentados en este estudio, se logró clonar MAP3773c en el plásmido TOPO pCR 2.1 para posteriormente clonarlo en el vector de expresión pRSET en *E. Coli* TOP10F DH5 α y expresarlo en la cepa BL21 (DE3) de *E.coli* inducido con IPTG, ya que fue la cepa donde se obtuvo la expresión de la proteína recombinante MAP3773c. En las cepas BL21 (DE3)plysS y BL21, si se obtuvieron clones en el experimento de transformación que fueron positivas a MAP3773c comprobándose con PCR y por digestión con las enzimas *SacI* y *HindIII*, así como también utilizando los controles de TOPO-MPA3773c y pRSET-70, sin embargo en experimentos posteriores no se observó la expresión en SDS-PAGE, así como tampoco se observó en los ensayos con Western blotting. Se intentó expresar la proteína recombinante MAP3773c en estas dos cepas BL21(DE3)plysS y BL21 porque la posibilidad de que expresaran proteínas no inducidas potencialmente tóxicas es muy baja. Sin embargo una de las posibles explicaciones a esto es que en las cepas BL21(DE3)plysS y BL21 el nivel de expresión no es tan alta como en la cepa BL21 (DE3). Así mismo para demostrar la presencia de la proteína recombinante de

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

VII. DISCUSIONES

Entre las mayores necesidades para la lucha eficaz contra la paratuberculosis son nuevas herramientas de diagnóstico que identifiquen con mayor precisión a los animales infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Desafortunadamente, el diagnóstico de la enfermedad de Johne se ha visto obstaculizado por la falta de ensayos sensibles y específicos, así como una falta de antígenos que lo distinguen de otras micobacterias estrechamente relacionados, incluyendo *M. avium* subsp. *avium*.^[1] La presencia del gen *fur* ha sido identificada por reacción de PCR en diferentes especies de micobacterias, incluyendo: *Mycobacterium simiae*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. terrae*, *M. smegmatis*, *M. abscessus*, and *M. avium*^[63]. Fur, que está principalmente involucrado en la regulación del metabolismo del hierro, ahora se sabe que regula un gran número de genes^[61]. La relación entre Fur y la patogenia está sin duda relacionada con la limitación de hierro que sufren estos microbios en diferentes hábitats. Aunque a pesar de extensos estudios sobre las funciones de Fur en diferentes organismos, el cuadro de este es aún incompleto^[59]. En este estudio se muestra el alineamiento de la proteína MAP3773c de MAP en la figura 9 con la misma proteína pero con otras especies de bacterias, donde el sombreado amarillo indica los sitios de unión de Fur. La proteína identificada en este estudio MAP3773c muestra un alto nivel de identidad con otras proteínas Fur conocidos^[62] de otras especies bacterianas que han sido reportados en diferentes estudios. El importante papel de Fur como proteína fue descrito por primera vez en *E. coli*. Se han encontrado más de 90 genes de diversas cepas de *E. coli* que se rige por la proteína Fur y por hierro^[64]. Una vez que la proteína Fur está unida a su ADN diana,

se bloquea el acceso de la ARN polimerasa, reprimiendo de ese modo los genes rio abajo. Se ha demostrado que Fur controla dos pequeños RNAs reguladores (rhyA y rhyB), que a su vez regulan la expresión de otros genes implicados en el metabolismo del hierro ^[63, 65]. Ha habido muchos informes de experimentos en los que las mutaciones en algunos genes de transporte de hierro dependientes de Fur impidieron la invasión sucesiva por el patógeno. Aunque el papel de Fur en la patogénesis es aun objeto de estudio ^[63, 66], incluso en esta etapa es claro que Fur puede ser un blanco prometedor para el diseño de fármacos ^[66]. En este trabajo se utilizó MAP3773c que es la nomenclatura porque aún no se descubre si la proteína tiene la misma función que la proteína Fur. Por lo mencionado anteriormente hace necesario el desarrollo de más estudios incorporando técnicas adicionales para lograr un mejor conocimiento del papel que juega la proteína MAP3773c particularmente en *MAP*.

VIII. CONCLUSIONES

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

IX. BIBLIOGRAFÍA

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

11. Gesgam Magombedze, Calistus N. Ngonghala, Cristina Lanzas. Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne’s Disease through Mathematical Modelling.
12. Stabel J. Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Animal Health Research Reviews* 7: 61–70 (2007)
13. USDA (2011) Johne’s diseases dairy. National Johne’s Education Initiative 2 (3).
14. Lingling Li et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PNAS* August 30, 2005 vol. 102 no. 35
15. D. J. WEISS AND C. D. SOUZA. Modulation of Mononuclear Phagocyte Function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 45:829–841 (2008)
16. Cossu et al. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and SLC11A1 polymorphisms in Sardinian multiple sclerosis patients. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(3):203-207
17. John P. Bannantine et al. Genome Scale Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Reveals Potential Diagnostic Sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40(4):1303.
18. Judith T. Murphy et al. Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol Genomics* 28: 67–75, 2006.
19. Naiara Abendaño. Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Responses to Infection: A Common Denominator of Human and Bovine Macrophages. Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Volume 2013, Article ID 908348.
20. E.J.B. Manning & M.T. Collins *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 2001,20 (1), 133-150
21. Tania Di Pietrantonio, Carmen Hernandez, Manon Girard, Annie Verville, Marianna Orlova, Adam Belley, Marcel A. Behr, J. Concepcion Loredó-Osti, Erwin Schurr Strain-Specific Differences in the Genetic Control of Two Closely Related Mycobacteria. October 2010 , Volume 6
22. Davide Cossu, Speranza Masala, Eleonora Cocco, Daniela Paccagnini, Stefania Tranquilli, Jessica Frau, Maria Giovanna Marrosu, Leonardo Antonio Sechi. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and SLC11A1 polymorphisms in Sardinian multiple sclerosis patients. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(3):203-207.
23. John P. Bannantine, a Lingling Li, Michael Mwangi, Rebecca Cote, Juan A. Raygoza Garay, Vivek Kapurb. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Isolated from Human Breast Milk. January/February 2014 Volume 2 Issue 1
24. CHARLOTTE HETZEL, RINY JANSSEN, SARAH J. ELY, NANNA M. KRISTENSEN, KAREN BUNTING, JONATHAN B. COOPER, JONATHAN R. LAMB, DOUGLAS B. YOUNG, AND JELLE E. R. THOLE. An Epitope Delivery

- System for Use with Recombinant Mycobacteria. *INFECTION AND IMMUNITY*. Aug. 1998, p. 3643–3648
25. Phillip Trefz, Heike Koehler, Klaus Klepik, Petra Moebius, Petra Reinhold, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch. Volatile Emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Mirror Bacterial Growth and Enable. Distinction of Different Strains. October 2013 | Volume 8 | Issue 10.
 26. D. J. WEISS, O. A. EVANS, M. DENG, AND M. S. ABRAHAMSEN Gene Expression and Antimicrobial Activity of Bovine. Macrophages in Response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 41:326–337 (2004)
 27. D. J. WEISS AND C. D. SOUZA. REVIEW PAPER: Modulation of Mononuclear Phagocyte Function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 45:829–841 (2008).
 28. Maria Laura Mon, Mariana Viale, Guido Baschetti, Fiorella Alvarado Pinedo, Andrea Gioffre, Gabriel Traveria, Peter Willemsen, Douwe Bakker, and Maria Isabel Romano. Search for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. *Veterinary Medicine International*. Volume 2012, Article ID 860362.
 29. Janagama et al. Iron-sparing Response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiology* 2010, 10:268
 30. Sharmistha Banerjee, Aisha Farhana, Nasreen Z. Ehtesham, Seyed E. Hasnain. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria. *Infection, Genetics and Evolution* 11(2011)825–838.
 31. Erin E. Johnson a, Marianne Wessling-Resnick. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes and Infection* 14 (2012).
 32. Kristopher E. Van Zandt, Fatoumata B. Sow. The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. *Journal of Leukocyte Biology*. Volume 84, September 2008.
 33. J.M. Blackwell, T. Goswami, C.A. Evans, D. Sibthorpe, N. Papo, J.K. White, S. Searle, E.N. Miller, C.S. Peacock, H. Mohammed, M. Ibrahim. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance, *Cell Microbiol.* 3 (2001) 773e784.
 34. M.F. Cellier, P. Courville, C. Campion, Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense, *Microb. Infect.* 9 (2007) 1662e1670.
 35. Fikret Aydemir, Supak Jenkitkasemwong, Sukru Gulec, and Mitchell D. Knutson Iron Loading Increases Ferroportin Heterogeneous. Nuclear RNA and mRNA Levels in Murine J774 Macrophages. 2009 American Society for Nutrition.
 36. PAUL PICCINELLI and TORE SAMUELSSON. Evolution of the iron-responsive element. *RNA* (2007), 13:952–966.
 37. Tomas Ganz. Cellular iron: Ferroportin is the only way out. *CELL METABOLISM*, MARCH 2005

38. D. Pérez Surribas. Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. *Química Clínica* 2005; 24 (1) 5-40
39. Michael J Cipriano¹, Pavel N Novichkov, Alexey E Kazakov, Dmitry A Rodionov, Adam P Arkin, Mikhail S Gelfand, and Inna Dubchak. RegTransBase – a database of regulatory sequences and interactions based on literature: a resource for investigating transcriptional regulation in prokaryotes. *BMC Genomics* 2013, 14:213
40. Bryan Troxell and Hosni M. Hassan. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 02 October 2013.
41. Yalbi Itzel Balderas-Martinez, Michael Savageau, Heladia Salgado, Ernesto Perez-Rueda, Enrique Morett, Julio Collado-Vides. Transcription Factors in *Escherichia coli* Prefer the Holo Conformation. *PLoS ONE* 8(6): e65723. doi:10.1371/journal.pone.0065723
42. Steven Hahn and Elton T. Young. Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. *Genetics*, Vol. 189, 705–736 November 2011
43. Dev Bhatt and Sankar Ghosh. Regulation of the NF- κ B-mediated transcription of inflammatory genes. *Frontiers in Immunology*. February 2014|Volume 5|Article 71.
44. Beth M. Carpenter, Jeannette M. Whitmire, and D. Scott Merrell. This Is Not Your Mother's Repressor: the Complex Role of Fur in Pathogenesis. *INFECTION AND IMMUNITY*, July 2009, p. 2590–2601 Vol. 77, No. 7
45. LUCIA ESCOLAR, JOSE PEREZ-MARTIN, AND VICTOR DE LORENZO. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. Oct. 1999, p. 6223–6229 Vol. 181, No. 20
46. Anuradha Alahari, Anil Kumar Tripathi, Daniel Le Rudulier. Cloning and Characterization of a fur Homologue from *Azospirillum brasilense* Sp7 *CURRENT MICROBIOLOGY* Vol. 52 (2006), pp. 123–127
47. Klaus Hantke. Members of the Fur Protein Family Regulate Iron and Zinc Transport in *E. coli* and Characteristics of the Fur-Regulated FhuF Protein. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (2002) 4(3): 217–222.
48. Zehua Chen, Karen A. Lewis, Ryan K. Shultzaberger, Ilya G. Lyakhov, Ming Zheng, Bernard Doan, Gisela Storz and Thomas D. Schneider. Discovery of Fur binding site clusters in *Escherichia coli* by information theory model. *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 20
49. Ludovic Pecqueur, Benoît D'Autr aux, J rome Dupuy, Yvain Nicolet. Structural changes of *E. coli* Fur during metal dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* May 11, 2006 .
50. Renata Grifantini, Shite Sebastian, Elisabetta Frigimelica, Monia Draghi, Erika Bartolini, Alessandro Muzzi, Rino Rappuoli, Guido Grandi and Caroline Attardo

- Genco. Identification of iron-activated and repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. 9542–9547, PNAS, August 5, 2003 vol. 100, no. 16
51. Xin-Wei Yang, Ying He, Jun Xu, Xiang Xiao, Feng-Ping Wang. The Regulatory Role of Ferric Uptake Regulator (Fur) during Anaerobic Respiration of *Shewanella piezotolerans* WP3. PLOS ONE. October 2013 | Volume 8 | Issue 10 | e75588
 52. MING ZHENG, BERNARD DOAN, THOMAS D. SCHNEIDER, AND GISELA STORZJOURNAL. OxyR and SoxRS Regulation of *fur*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY Aug. 1999, p. 4639–4643. Vol. 181, No. 15
 53. C. Daniela Rinaudo, John L. Telford, Rino Rappuoli, and Kate L. Seib. Vaccinology in the genome era. The Journal of Clinical Investigation Volume 119 Number 9 September 2009
 54. Tim J Bull, Alex Schock, J Michael Sharp, Mandisa Greene, Iain J McKendrick, Jill Sales, Richard Linedale, Karen Stevenson. Genomic variations associated with attenuation in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine strains. BMC Microbiology 2013, 13:11
 55. Vikalp Vishwakarma, Niladri Bhusan Pati, Himanshu Singh Chandel, Sushree Sangeeta Sahoo, Bhaskar Saha, Mrutyunjay Suar. Evaluation of Salmonella enterica Serovar Typhimurium TTSS-2 Deficient *fur* Mutant as Safe Live-Attenuated Vaccine Candidate for Immunocompromised Mice. PLOS ONE December 2012 | Volume 7 | Issue 12 | e52043
 56. Javier Santander, Greg Golden, Soo-Young Wanda, and Roy Curtiss. Fur-Regulated Iron Uptake System of *Edwardsiella ictaluri* and Its Influence on Pathogenesis and Immunogenicity in the Catfish Host. August 2012 Volume 80 Number 8 Infection and Immunity
 57. Felix Bastida and Ramon A Juste. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. Journal of Immune Based Therapies and Vaccines 2011, 9:8
 58. Murray E. Hines, Sue E. Turnquist, Marcia R. S. Ilha, Sreekumari Rajeev, Arthur L. Jones, Lisa Whittington, John P. Bannantine, Raúl G. Barletta, Yrjö T. Gröhn, Robab Katani, Adel M. Talaat, Lingling Li, and Vivek Kapu. Evaluation of novel oral vaccine candidates and validation of a caprine model of Johne's disease. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4: 26.
 59. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. Arch Biochem Biophys. 2014 Mar 15;546C:41-52. doi: 10.1016/j.abb.2014.01.029. Epub 2014 Feb 7. Review.
 60. Sarman Singh, Krishnamoorthy Gopinath *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's Regional Ileitis: How Strong is Association? Journal of Laboratory Physicians / Jul-Dec 2011 / Vol-3 / Issue-2
 61. Dubrac S, Touati D. Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. Microbiology. 2002 Jan;148(Pt 1):147-56.

62. Haraszthy VI, Lally ET, Haraszthy GG, Zambon JJ. Molecular cloning of the fur gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Infect Immun. 2002 Jun;70(6):3170-9
63. Milano A, Branzoni M, Canneva F, Profumo A, Riccardi G. The Mycobacterium tuberculosis Rv- 2358-furB operon is induced by zinc. Res Microbiol, 2004;155:192–200.
64. Jiang H, Gao X, Li Y, Xu ZK, Wang LM, Bai XF, Yue Y. Prokaryotic expression and monoclonal antibody preparation of Mycobacterium tuberculosis ferric uptake regulator B. APMIS. 2008 May;116(5):372-81. doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.00975.x
65. Masse´ E and Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:4620–5.
66. Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. Nucleic Acids Res 2001;29:5195–206.