



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORINA

FACULTA DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA.
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIA DE LA SALUD.

“INTERACCIÓN DE MAP3773c EN LA CROMATINA DE
FERROPORTINA 1 DE MACRÓFAGOS DE RATÓN J774 A.1”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

QFB. DANIA MELISSA DIAZ PADILLA

Directora de Tesis:

Dra. Bertha Landeros Sánchez

TIJUANA B.C.

AGOSTO 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.363
Tijuana, B.C., a 17 de Junio, 2024

C. DANIA MELISSA DIAZ PADILLA
Pasante de: Maestría en Ciencias de la Salud.
Presente


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


Es propuesto, por las C. Dra. Bertha Landeros Sánchez y
Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala

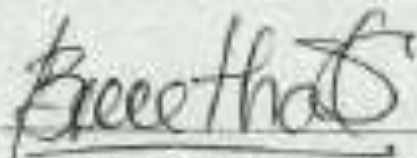
Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema "INTERACCIÓN DE MAP3773c EN LA CROMATINA DE FERROPORTINA 1 DE
MACRÓFAGOS DE RATÓN J774 A.1"


El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. RESUMEN
- II. ANTECEDENTES
- III. INTRODUCCIÓN
- IV. JUSTIFICACIÓN
- V. HIPÓTESIS
- VI. OBJETIVO GENERAL
- VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS
- VIII. MATERIALES Y MÉTODOS
- IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- X. CONCLUSIONES
- XI. REFERENCIAS
- XII. ANEXOS


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dra. Bertha Landeros Sánchez
Directora De Tesis


Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Co-Directora De Tesis



INDICE DE CONTENIDO.

I. RESUMEN	4
II. ANTECEDENTES	
2.1. Paratuberculosis bovina (Enfermedad de Johne)	5
2.2. <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> (MAP)	6
2.3. Mecanismos de patogenicidad de MAP	7
2.4. Enfermedad de Crohn	9
2.5. Diagnóstico de MAP	11
2.6. Control y tratamiento de infecciones por MAP	13
III. INTRODUCCION	
3.1. Hierro	16
3.2. Homeostasis del hierro	16
3.3. Ferroportina	17
3.4. Proteínas Fur.	18
3.5. Proteína MAP3773c	20
IV. JUSTIFICACION	22
V. HIPOTESIS	23
VI. OBJETIVO GENERAL	23
VII. OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
VIII. MATERIALES Y METODOS	
8.1. Cultivo de macrófagos J774 A.1 de ratón	24
8.2. Tratamiento de macrófagos J774 A.1 de ratón	24
8.3. Western blot	25
8.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).	27
8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final y electroforesis	31

IX.	RESULTADOS Y DISCUSION	
9.1.	Western blot	32
9.2.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) - PCR	36
X.	CONCLUSIONES	40
XI.	REFERENCIAS	41
XII.	ANEXOS	
	ANEXO I: SOLUCIONES Y REACTIVOS	43
	ANEXO 2: MARCADOR DE PESO MOLECULAR	45
	ANEXO 3: ABREVIATURAS	47

I. RESUMEN

La paratuberculosis bovina es una enfermedad caracterizada por una lesión intestinal crónica proliferativa que tiene como agente causal la bacteria *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). MAP tiene una amplia distribución en el mundo debido a su desprendimiento en heces, la ruta de transmisión más frecuente es la vía oro-fecal, a través del pastizal, la leche y el agua contaminada con heces de animales asintomáticos y clínicamente enfermos. Es un bacilo ácido-alcohol resistente, intracelular, que tiene una alta capacidad de sobrevivir y adaptarse en el interior de la célula fagocítica, prevenir la activación del macrófago, bloquear la acidificación y maduración del fagolisosoma y atenuar la presentación de antígenos.

En modelos de cultivos celulares el exceso de hierro incrementa notablemente el crecimiento de la micobacteria. De modo que es evidente que la modulación del hierro en el huésped impacta al crecimiento intracelular de patógenos.

El uso de proteínas Fur como mecanismo de patogenicidad es un proceso que se ha observado en un gran número de especies bacterianas, a través de estas proteínas múltiples patógenos logran regular el metabolismo del hierro a favor. Se ha identificado la expresión de proteínas Fur en la cepa *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* K-10, tal como MAP3773c, motivo del presente trabajo.

II. ANTECEDENTES

2.1. Paratuberculosis Bovina

La enfermedad de Johne o paratuberculosis bovina es una enfermedad caracterizada por una lesión intestinal crónica proliferativa que tiene como agente causal la bacteria *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Esta patología consiste en una enteritis crónica y linfadenopatía mesentérica, que cursa con signos histológicos en mucosa tales como, formación de granulomas dispersos que se localizan generalmente a nivel del íleon o en la zona adyacente del colon¹.

En ganado vacuno la infección por MAP comúnmente ocurre en terneros recién nacidos, por vía oro-fecal. Sin embargo, los síntomas clínicos, incluyendo predominantemente diarrea persistente y pérdida de peso, suelen aparecer hasta los 3 a 5 años de edad en el animal².

En el proceso de infección por MAP se ha propuesto que el microorganismo cruza del lumen del intestino delgado hacia el sistema linfático a través de las células M epiteliales. La bacteria es capturada por macrófagos epiteliales los cuales una vez activados, inducen la activación de las células T y la expansión clonal, dando paso a la respuesta inmune. Esta activación implica una respuesta inicial TH1 caracterizada por un infiltrado tisular distinguido principalmente por linfocitos con pocos o ningún organismo detectable, respuesta que parece ser predominante durante la etapa subclínica de la infección por MAP. La fase subclínica de la infección puede perdurar por meses o años, ya que los bacilos se encuentran contenidos dentro de macrófagos y granulomas microscópicos. La memoria continua de células T y su respuesta es requerida para mantener esos granulomas, contener la diseminación de la bacteria y minimizar el daño tisular³.

Los animales típicamente comienzan a exhibir signos clínicos no específicos, tales como pérdida de peso, y diarrea, cuando entran en la etapa TH2 o lepromatosa de la infección, aun no se conoce qué desencadena esta transición. La afluencia de células inflamatorias causa un engrosamiento de la pared intestinal comprometiendo su funcionalidad, conduciendo a una enteropatía por malabsorción y pérdida de proteínas. En esta fase de la infección, MAP puede diseminarse dentro del tracto gastrointestinal y hacia otros órganos, tal como lo muestran las lesiones compuestas por macrófagos infiltrados, cargados con microorganismos, en riñón, hígado, glándula mamaria, etc. Los animales clínicamente afectados en esta fase de la enfermedad de Johne usualmente sucumben a la infección en pocas semanas³.

La paratuberculosis en animales por sí misma tiene un impacto económico para el sector pecuario, debido a sus consecuencias en la disminución de la producción de leche, la disminución del valor comercial del ganado enfermo y la eventual muerte del mismo¹.

Prevalencia estimada de MAP por rebaño lechero durante el 2021 para regiones productoras de lácteos fue de 21.6% en Estados Unidos y del 42% en Canadá^{4,5}. Cada año se enfrentan pérdidas de hasta 198 millones de dólares para Estados Unidos y 28 millones de dólares para Canadá por causa de la paratuberculosis bovina⁴.

Latinoamérica no escapa a la problemática, aunque no dispone de caracterización epidemiológica, cifras oficiales, ni programas de control. Sin embargo, algunas investigaciones basadas en la técnica de inmunoensayo enzimático⁶ (ELISA, por sus siglas en inglés) revelan tasas de positividad elevadas^{7,8}.

La información epidemiológica que se tiene en México sobre ganado afectado por MAP es escasa. Se ha encontrado en el país una seroprevalencia de MAP en ovinos de hasta el 44% en estados como México y Jalisco, y del 7.8% para Baja California⁹.

Aunque la información sobre MAP en ganado bovino es limitada en México, en 2015 se ha reportó una seroprevalencia general del 5% en rebaño destinado a la producción de leche en el país, siendo Hidalgo, un estado con alta densidad de ganado lechero, el estado con mayor prevalencia (50%)¹⁰.

2.2. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es una bacteria perteneciente al complejo *Mycobacterium avium* del género *Mycobacterium* y la familia *Mycobacteriaceae*¹¹.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo, Gram positivo, ácido alcohol resistente y aerobio. Es un bacilo pequeño (0.5 x 1.5 µm) cuya temperatura óptima de crecimiento es 37°C. Es una bacteria de crecimiento lento, con un tiempo de generación mayor a 20 h, requiere varias semanas de incubación antes de que las colonias sean detectables en los medios de cultivo. La pared celular de MAP es gruesa y cerosa, compuesta por capas de micolato y peptidoglucano, unidas por arabinogalactano. Como característica específica de esta especie destacan su dependencia del sideróforo micobactina para el crecimiento in vitro^{1,11}.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* o MAP tiene la capacidad de infectar a un gran número de especies animales. Actualmente se reconocen dos principales variantes de

MAP de acuerdo al tipo de ganado a partir de cual se han aislado: Tipo I (ganado ovino) y Tipo II (ganado vacuno)¹². También se le ha encontrado infectando protozoos para sobrevivir a las condiciones del medio ambiente¹. MAP tiene una amplia distribución en el mundo debido a su desprendimiento en heces, la ruta de transmisión más frecuente es la vía oro-fecal, a través del pastizal, la leche y el agua contaminada con heces de animales asintomáticos y clínicamente enfermos, sin embargo, la transmisión vertical a través de la placenta y el semen también se ha sugerido¹³. La supervivencia intracelular de MAP se le atribuye a su capacidad para alterar la maduración del fagosoma dentro del macrófago, evitando su acidificación progresiva y su fusión con los lisosomas¹.

La cepa MAP K10 tienen un genoma sencillo circular de 4829781 pares de bases y un contenido de GC de 69.3%. Uno de los principales descubrimientos fue la delección observada en *mbtA*, un gen conocido por iniciar la síntesis de micobactinas⁵.

Se han encontrado 6 inserciones genómicas de polimorfismos largos exclusivas de *M. avium subsp. paratuberculosis*; LSP4, LSP11, LSP12, LSP14, LSP15 y LSP16. La secuencia de polimorfismos más larga, LSP14 incluye varios genes relacionados con la adquisición de metales, incluyendo absorción de sideróforos (MAP3726 a MAP3729), captación de metales inorgánicos (MAP3731 a MAP3736) y biosíntesis de sideróforos (MAP3740 a MAP3746). LSP15 de 5.4 Kb contiene otro operón para el transporte de metales en el que se incluye el regulador transcripcional dependiente de metal tipo Fur (MAP3773c)¹².

2.3. Mecanismos de patogenicidad de MAP.

Se ha observado en ensayos empleando modelos de ratón que, después de la ingestión, la unión de MAP y la translocación a través de la mucosa intestinal está mediada por células M y enterocitos¹¹. Uno de los factores que participan en la adherencia inicial a la mucosa intestinal por parte de MAP es la expresión de la proteína fijadora de fibronectina (FAP), la cual le permite unirse a las integrinas de las células M para facilitar el ingreso a la submucosa, donde encontrará los macrófagos¹⁴. Estudios en cultivos de tejido demostraron que MAP afecta la formación de uniones estrechas en la mucosa intestinal, desencadenando un incremento en la permeabilidad¹¹.

Los bacilos son posteriormente fagocitados por macrófagos subepiteliales e intraepiteliales. Los receptores del macrófago que podrían verse involucrados en la fagocitosis de MAP incluyen los receptores del complemento (CR1, CR3, CR4), los receptores de

inmunoglobulinas (FcR), el receptor de manosa (MR), el receptor de integrinas CD14 y receptores tipo Toll (TLR, o Toll-Like Receptors)¹⁴. Una vez dentro de las células fagocíticas, la capacidad de MAP para sobrevivir y replicarse dentro de estas células juega un papel clave en la patogénesis¹¹.

Posterior a la fagocitosis de MAP por el macrófago se inician una serie de fenómenos de activación de la célula fagocítica seguida de la síntesis de citoquinas, quimioquinas y metabolitos antimicrobianos¹⁴.

Por ser un patógeno que se multiplica en el citoplasma de células presentadoras de antígeno, la respuesta más efectiva contra MAP es la mediada por citoquinas tipo TH1, entre ellas el interferón gama (INF-g), el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF-a) y la IL-2. Esto implica, en macrófagos, la generación de óxido nítrico, expresión de moléculas CMH inducida por INF-g y la activación de procesos de apoptosis. En células NK y en los LT CD8+, IL-2 estimula la actividad citotóxica sobre los macrófagos infectados¹⁴.

Las vías de señalización MAPK y JAK/STAT1/2 son las vías principalmente involucradas en la activación del macrófago y la respuesta antiinflamatoria. La activación inicial de MAPKp38 promueve la expresión de IL-10, evento favorable para la micobacteria; por el contrario, la activación de MAPK ERK1 promueve la expresión de TNF α , evento favorable para la actividad microbicida del macrófago. Las cepas patógenas de MAP inducen preferencialmente la vía de señalización de MAPKp38 a través de su fosforilación, cuyo resultado es el aumento de la expresión de IL-10. La activación del receptor del IFN γ induce la activación de la vía de señalización JAK-STAT1/2; que deriva en la producción de óxido nítrico por el macrófago, para la destrucción de MAP dentro de la vacuola fagocítica. La principal función de la IL-10 consiste en suprimir la respuesta inmune tipo Th1 y con esto, alterar la actividad microbicida del macrófago, lo que favorece la evasión de la respuesta inmune efectiva contra MAP y propicia la formación de granulomas en los sitios de presencia de la bacteria, particularmente en la lámina propia del intestino delgado¹⁴.

Está claro que para una eliminación eficiente de MAP, debe predominar inicialmente, la generación de una respuesta inmune de tipo celular¹⁴. Sin embargo, MAP predominantemente, impulsa a las células T auxiliares del ganado infectado a experimentar una respuesta Th2 con una expresión mejorada de IL-4, IL-5, IL-10 e inhibidores de los factores de remodelación del tejido¹¹. Se ha observado, en los hospederos susceptibles a la infección por MAP (bovinos que desarrollan las fases clínicas de la enfermedad) que,

debido a su pared celular rica en lípidos, lipoarabinomananos (LAM) y arabinomananos (AM); componentes que son altamente inmunógenos, MAP logra desencadenar procesos asociados con la respuesta inmune de tipo humoral o TH2 desviando la respuesta del hospedero y alterando la respuesta efectora de tipo citotóxica. Dicha alteración de la respuesta inmune es al parecer uno de los mecanismos de las cepas virulentas de MAP para causar la enfermedad¹⁴.

MAP tiene una alta capacidad de sobrevivir y adaptarse en el interior de la célula fagocítica, prevenir la activación del macrófago, bloquear la acidificación y maduración del fagolisosoma y atenuar la presentación de antígenos a los LT¹⁴.

Por otro lado, algunos investigadores han sugerido la posibilidad de que MAP sea capaz de entrar en un estado latente o no cultivable en el que es posible la reversión al crecimiento vegetativo cuando existen condiciones ambientales más favorables. La latencia o dormancia está bien documentada con respecto a otras especies de micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG. MAP posee la capacidad de pasar a un estado "latente" o no replicante persistente en el que el metabolismo se reduce a un nivel basal extremadamente bajo como parte de una respuesta adaptativa a la anaerobiosis¹⁵

Estos organismos "adaptados de forma latente" pueden persistir durante años o décadas hasta que se produzca la reactivación debido a una variedad de factores, incluida la disminución de la inmunovigilancia. Recientemente, algunos investigadores señalaron que, aunque la mayoría de los humanos parecen ser susceptibles a la infección por MAP, pocos desarrollan signos y síntomas clínicos inmediatamente después de la exposición¹⁵

Una vez adaptado al estado "latente", el MAP puede exhibir una diferencia en la susceptibilidad a varios antibióticos. En cultivo, *M. tuberculosis* adaptado de forma latente no es susceptible a la mayoría de los fármacos antimicobacterianos de primera línea comúnmente utilizados; sugiriendo que esta población de bacilos no puede ser eliminada por la terapia antimicrobiana convencional, que se basa en el crecimiento activo de los bacilos para ser efectiva¹⁵.

2.4. Enfermedad de Crohn.

Desde 1913 fue sugerida una posible asociación entre *M. avium subsp. paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn (EC) en humanos, cuando se encontraron similitudes patológicas y sintomatológicas entre humanos y animales con enfermedad de Johne¹⁶.

La enfermedad de Crohn (EC) es un desorden sistémico que afecta a los humanos y causa principalmente la inflamación crónica del intestino, con una apariencia macroscópica similar a la que se observa en bovinos con paratuberculosis, lo cual hace suponer una asociación causal de MAP para ambas patologías. La patogénesis de esta enfermedad es compleja y parece ser multifactorial^{1,16}.

La comparación de las secuencias de genomas de MAP aislada en humanos y animales demostró una relación filogenética basada en polimorfismos de un solo nucleótido que proporcionan evidencia de una transmisión zoonótica de animales domésticos a humanos¹³. Los antecedentes bibliográficos citan que, en casos clínicos de pacientes con EC se ha detectado ADN de *M. avium subsp. paratuberculosis* por medio de PCR en el 90% de los casos estudiados, por hibridación in situ en el 70% de los casos, y por RT-PCR (RNA) en el 100% de los casos. Por otro lado, MAP ha sido cultivado en enfermos de Crohn en heces, tejido intestinal y en muestras de sangre periférica¹⁶.

La enfermedad de Crohn es una enfermedad intestinal inflamatoria transmural en la cual se presenta un trastorno de la permeabilidad intestinal provocando mala absorción y desnutrición. Se han observado lesiones granulomatosas presentes en el 30% de las biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn con lo cual se ha convertido en un signo característico de utilidad para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades intestinales inflamatorias¹.

Se ha desarrollado la hipótesis de que MAP es un posible agente causal de la enfermedad de Crohn debido a su identificación a partir del aislamiento directo del patógeno desde los tejidos afectados en pacientes con esta enfermedad y a las similitudes fisiológicas de las lesiones ocasionadas. La asociación MAP-EC está fundamentada en tres aspectos que establecen un vínculo entre MAP y la enfermedad de Crohn, mismos que se describen a continuación.

1. La incidencia de ambas enfermedades, tanto para la enfermedad de Crohn como para la paratuberculosis bovina, es creciente desde que ambas enfermedades fueron descritas, teniendo zonas geográficas en común.
2. La identificación de pacientes afectados por la enfermedad de Crohn, infectados simultáneamente por MAP.
3. MAP se caracteriza por presentar una respuesta inflamatoria desencadenando una enfermedad crónica.

Aun con la evidencia que podrían vincular ambas enfermedades, la aceptación de dicha hipótesis continúa aun en discusión, esto debido a que existen estudios en los que no se ha detectado MAP en personas afectadas por la enfermedad de Crohn y a que aún se desconoce el papel específico que tendría la bacteria en el desarrollo de la patología¹.

Independientemente de su asociación como agente causal de la enfermedad de Crohn, MAP se ha encontrado infectando al ser humano, lo cual sugiere una infección zoonótica que puede ser consecuencia de distintas vías de transmisión. La leche y otros derivados lácteos constituyen el principal riesgo para la transmisión de la bacteria, aun cuando la pasteurización disminuye considerablemente el riesgo este no se elimina completamente debido a la característica pared bacteriana de MAP. La contaminación también puede deberse en segundo plano a la ingesta de otros tipos de alimentos como carnes bovinas, además de encontrarse en aguas de superficie y en la tierra¹.

2.5. Diagnóstico de MAP

El diagnóstico oportuno de la paratuberculosis bovina enfrenta limitaciones entre las que se encuentran el largo periodo de incubación y la lenta progresión de MAP¹⁷.

Existen tres vertientes básicas en el diagnóstico de la PTB; 1) Análisis histopatológico que revela las lesiones en el tejido infectado 2) Búsqueda directa del agente causal de la enfermedad (*M. avium subsp. paratuberculosis*) y/o 3) Búsqueda de indicadores de la respuesta inmunológica a la infección (citosinas, anticuerpos o lesiones intestinales características)¹⁸.

La detección de MAP en heces, sangre, leche y tejidos a través de microscopia es una técnica de diagnóstico directa que ofrece la ventaja de ser rápida y fácil a través de la tinción de muestras por la técnica de Ziehl-Neelsen que puede revelar la presencia de bacilos micobacteriales. Aunque la sensibilidad de esta técnica es baja y depende en gran medida de la adecuada obtención de una muestra representativa, por lo que la detección de formas bacilares por esta técnica es poco probable^{3,18}.

La prueba de elección para la identificación de MAP es el cultivo bacteriológico de muestras de heces, leche o tejido lesionado. La sensibilidad del ensayo puede variar ya que algunas cepas de MAP son más difíciles de aislar que otras. Debido a que otras especies de micobacterias pueden encontrarse en muestras fecales, todos los aislamientos deben ser confirmados con el test de dependencia de micobactina, el cual se basa en el crecimiento

en un medio suplementado únicamente con micobactina. Aunque por mucho tiempo este método de diagnóstico ha sido ampliamente utilizado, requiere un periodo de tiempo prolongado para su interpretación (12 o 16 semanas), además de emplear medios altamente enriquecidos^{1,3}.

Existen dos métodos básicos para el cultivo convencional de MAP en un medio sólido: El medio Löwenstein–Jensen (LJ) con ácido oxálico y NaOH y el medio yema de huevo de Herrold (HEYM) que emplea cloruro de hexadecilpiridinio (HPC). Aunque en la actualidad se siguen investigando y desarrollando nuevos medios de cultivo para optimizar el crecimiento de MAP en cultivo sólido^{19,20}. Por otro lado, existe la técnica de cultivo radiométrico que emplea el medio líquido BACTEC™ 12B (Middlebrook 7H12) suplementado con yema de huevo el cual mide la liberación de ¹⁴CO₂ radioactivo como consecuencia del metabolismo bacteriano. Con este método se reduce el tiempo necesario para obtener resultados y se considera más sensible que los métodos de cultivo convencionales¹⁹

La búsqueda directa de MAP también se ha logrado a través de técnicas moleculares que se basan en la detección del material genético, hibridación in situ y PCR en donde la secuencia de inserción IS900 es el principal blanco de amplificación permitiendo resultados de alta sensibilidad, convirtiéndolo en el biomarcador de elección, sin embargo, existe la desventaja de que esta técnica es incapaz de diferenciar células viables de células muertas^{1,18}.

Los métodos mayormente empleados para el diagnóstico de PTB en ganado domestico a gran escala son la microscopia, el cultivo y la PCR. Sin embargo, también se ha hecho uso del estudio de la respuesta inmunológica para la detección de MAP.

Es importante señalar que, dada la patogénesis de la enfermedad, con el estadio final o producción intermitente de signos inmunológicos detectables de la infección, un resultado positivo proporciona el más útil dato diagnóstico. Un resultado negativo no significa que el animal es libre de la infección³.

Los métodos de diagnóstico inmunológicos se basan principalmente en la detección de anticuerpo contra MAP, siendo la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA) el método de elección por tratarse de una técnica rápida y de bajo costo, y que puede realizarse en suero o leche¹⁷. Una de desventaja que esta técnica enfrenta es su incapacidad para diferenciar

animales infectados por MAP de animales vacunados¹⁸. Otras pruebas serológicas incluyen la fijación de complemento (CF) y la inmunodifusión en gel de agar (AGIF)²¹.

Una de las desventajas que comparten la mayoría de las técnicas de diagnóstico es que logran identificar MAP en etapas avanzadas de la infección. Diversas propuestas de diagnóstico se han desarrollado para la identificación temprana de animales en etapa subclínica de la enfermedad a fin de lograr un mejor manejo del ganado infectado, tal como el ensayo de liberación INF- gamma el cual se ha propuesto y la prueba de hipersensibilidad cutánea retardada, Johnina intradérmica^{22,23}.

Por otro lado, se ha desarrollado un ensayo de flujo lateral (LFA) basado en nanopartículas de oro (GNP) que utiliza la proteína recombinante MAP2963 de MAP para la detección sensible y específica de PTB en condiciones de campo. Esta técnica ofrece un método in situ, rentable para el diagnóstico rápido de PTB²⁴.

2.6. Control y tratamiento de infecciones por MAP.

El reto más grande que enfrenta el control de la paratuberculosis bovina en animales de ganado es el diagnóstico oportuno de la enfermedad, dada la etapa subclínica de la enfermedad que cursa sin exhibir signos evidentes y la falta de pruebas diagnósticas que identifiquen MAP en etapas tempranas²⁵.

En la actualidad no existe un tratamiento satisfactorio para la paratuberculosis bovina, debido a que las lesiones ocasionadas por la bacteria en tejido intestinal suelen ser irreversibles²⁶.

No es común el tratamiento de la PTB, sin embargo se ha llevado a cabo en animales de compañía o de alto valor genético²⁵. En estos casos se suelen usar algunas combinaciones de antibióticos empleados en el tratamiento de la tuberculosis humana como isoniazida o rifampicina²⁶. Otros antimicobacterianos como la etionamida y aminoglucósidos como la gentamicina, neomicina y estreptomina pueden ser incluidos en el tratamiento²⁵.

Es importante considerar que *M. avium subsp. paratuberculosis* es sensible a relativamente pocos fármacos, los tratamientos requieren periodos de largo plazo, lo que podría no ser económicamente viable y la posibilidad de una recuperación completa es baja debido a las lesiones irreversibles²⁶.

Por otro lado, el uso de antibióticos en el tratamiento de ganado productor de leche o ganado para consumo humano no es recomendable ya que la leche de vacas tratadas

podría llegar al consumo humano atentando contra la inocuidad alimentaria. En la actualidad se estudian diversas alternativas de tratamiento, por ejemplo con probióticos, como es el caso de la administración de la bacteria *Dietzia* por vía oral en combinación con dexametasona²⁵

Hasta la fecha, la prevención y el control de la paratuberculosis resulta ser la mejor arma contra esta enfermedad. Mas que un problema individual, la PTB se considera un problema de rebaño, ya que cuando un caso clínico es identificado y diagnosticado en un hato las probabilidades de que la mayoría de los animales restantes se encuentren cursando alguna de las fases tempranas de la enfermedad es elevada²³. Controlar la enfermedad en un rebaño infectado no es tarea fácil. Tomando en cuenta que no existe un tratamiento satisfactorio que permita la recuperación completa del animal, el control de la infección se basa en la eliminación de los animales diagnosticados y la prevención de la transmisión de la enfermedad²⁵.

El riesgo de infección es máximo en los animales jóvenes, por lo que los animales recién nacidos en un rebaño son considerados como individuos susceptibles. Es importante que los animales recién nacidos sean separados de los adultos después de nacidos, y que solo sean alimentados con calostro de sus propias madres o hembras dentro del rebaño saludables y negativas a pruebas diagnóstico de PTB²⁵. Evitar en todo momento su exposición a las heces y leche contaminada elevando los comederos y bebederos²⁶. Procurar áreas exclusivas para el nacimiento de animales, limpias, desinfectadas, libres de contaminación fecal y separadas del resto del rebaño¹⁷.

Es importante el monitoreo constante del rebaño a través de la aplicación de pruebas diagnósticas de forma periódica, a fin de poder diagnosticar oportunamente la infección en individuos dentro del rebaño. Se recomiendan pruebas de ELISA y cultivo de heces en ganado adulto cada 6 meses como medida preventiva¹⁷.

Se ha reportado que MAP sobrevive a la pasteurización y es resistente a la mayoría de los desinfectantes y al tratamiento de agua potable, incluyendo cloración²⁶. Sin embargo, la adopción de medidas sanitarias generales puede aportar a la prevención y control de la PTB, estas prácticas incluyen; limpiar y desinfectar la áreas de ganado, evitar la contaminación fecal de alimentos y agua, evitar la sobrepoblación e implementar medidas de control en la entrada de nuevos animales al rebaño¹⁷. Los animales que ingresen al

rebaño deberán ser colocados en cuarentena y ser sometidos pruebas de diagnóstico antes de incorporarlos al rebaño.²⁶

La separación inmediata de animales adultos con signos clínicos sospechosos de PTB es primordial en el control de la infección en el rebaño, el ganado que resulte positivo a las pruebas diagnósticas deberá ser eliminado del rebaño y sacrificado²⁶.

Por otro lado, la vacunación, aunque prometedora como método de prevención es controversial, debido a su posible interferencia con el diagnóstico de la enfermedad y los programas de control de la tuberculosis¹⁷. En México la vacunación se ha aplicado a nivel experimental en cabras y borregos con resultados favorables en la prevención de PTB²³.

III. INTRODUCCION

3.1. Hierro

Es generalmente aceptado que el hierro es el más importante micronutriente utilizado por las bacterias²⁷. En humanos el hierro circula en plasma o en fluidos extracelulares en forma del complejo transferrina. Las células captan el complejo hierro-transferrina por medio de endocitosis mediada por receptores de transferrina y almacenan el hierro predominantemente en ferritina citoplásmica. Dos proteínas reguladoras (IRP1 e IRP2) funcionan como sensores citoplásmicos de hierro. Cuando el hierro celular es bajo, los IRPs estabilizan el ARNm del receptor de transferrina, incrementando así el número de receptores para la captación del hierro²⁸.

El hierro es un elemento que participa en la modulación de la respuesta inmune del hospedero contra patógenos mediante la regulación de sus concentraciones en las células del sistema inmune y el medio externo. Durante el proceso infeccioso los microorganismos utilizan varias estrategias para adquirir competitivamente el hierro del ambiente interno del hospedero²⁹. Por otro lado, la activación de células innatas por PAMPs inicia la síntesis de grandes cantidades de proteínas secuestrantes del Fe⁺² para limitar la disponibilidad del hierro para el patógeno, de este modo el huésped es capaz de remover inmediatamente el hierro de aquellos sitios donde el patógeno es detectado, en un proceso denominado "inmunidad nutricional"^{30,31}.

3.2. Homeostasis del Hierro

El hierro es utilizado por una variedad de reacciones de oxidación-reducción y cuando se encuentra formando complejo con protoporfirinas forma el grupo hemo, la principal molécula de unión a oxígeno. Aun cuando el hierro es un elemento esencial, su concentración en los fluidos biológicos debe ser altamente controlada. No existe un mecanismo regulador para la excreción de hierro en el organismo, sin embargo, los organismos multicelulares enfrentan este inconveniente transfiriendo el hierro de un tejido a otro.

Son cuatro los tejidos críticamente importantes para la homeostasis del hierro. La placenta y el intestino son responsables de la transferencia neta del hierro hacia el interior del organismo, mientras que los macrófagos y el tejido parenquimal como los hepatocitos, funcionan como sitios de reciclaje³².

Los macrófagos en el sistema retículo endotelial adquieren el hierro principalmente a través de la fagocitosis y la degradación de eritrocitos dañados o senescentes. Después de la captación el hierro dentro de la célula puede almacenarse en forma de ferritina o liberarse al espacio extracelular. Los macrófagos liberan el hierro hacia la circulación por medio de la proteína exportadora, Ferroportina³³. A la fecha la Ferroportina es la única proteína transportadora identificada en mamíferos, que exporta hierro desde la célula hacia el plasma^{33,34}.

3.3. Ferroportina

La Ferroportina también llamada Slc40a1, MTP1, o Ireg1, se encuentra en todos los tejidos donde los principales flujos de hierro son regulados, incluyendo enterocitos duodenales, trofoblastos placentarios, macrófagos y hepatocitos²⁸.

La topología de la Ferroportina no está aún bien definida con precisión y el número exacto de dominios transmembranales aún no es claro. Un modelo propuesto por Liu y colab., que sugiere la existencia de 12 dominios transmembranales es el modelo estructural más utilizado. Estudios indican que la región amino terminal de Ferroportina es citosólica. La ubicación de la región carboxilo-terminal aún no está clara. Otro tema controversial sobre la estructura de la Ferroportina es el hecho de si esta es una proteína monomérica o dimérica³².

Poco se conoce sobre el mecanismo del transporte de hierro mediado por Ferroportina. Se ha inferido que el sustrato de Ferroportina es Fe (II), basado en la observación de que el transporte del hierro requiere la activación de una ferroxidasa extracelular. Esta ferroxidasa es proporcionada por las oxidasas multicobre ceruloplasmina (Cp) y hefaestina. Estas oxidasas multicobre oxidan un átomo de hierro quitándole un electrón. Aun cuando la oxidación del hierro puede ocurrir también de forma no enzimática, en varios tipos celulares entre los que se incluyen los macrófagos, la falta de una oxidasa multicobre impide el transporte del hierro³².

Diversos mecanismos han demostrado regular la expresión de Ferroportina a nivel transcripcional, traduccional y post- traduccional. Carole Beaumont, describió que luego de la fagocitosis de los eritrocitos, el grupo hemo, liberado dentro del citosol, puede entrar al núcleo, activar el factor Bach1 y liberar la represión transcripcional de la expresión de genes codificantes de HO-1 y FPN, dando lugar al reclutamiento del activador transcripcional Nrf2 el cual forma un complejo con proteínas pequeñas Maf. Subsecuentemente la proteína HO-

1 degradará el grupo hemo y liberará el hierro que a su vez inactivará Proteínas de regulación del hierro (IPR's) y permitirá la transcripción de ARNm's que contienen Elementos de Respuesta al Hierro (IRE), (FPN y cadenas de Ferritina). El hierro es luego almacenado en ferritina o exportado de regreso al plasma por medio de FPN. Finalmente, hepcidina sérica puede unirse a Ferroportina de la superficie celular induciendo su internalización y degradación³⁵.

Se ha observado que el gen de ferroportina puede responder a la regulación transcripcional de diversos factores de transcripción. A través de técnicas de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) se logró observar que el factor nuclear de transcripción Nrf2 se une a la región promotora del gen promoviendo su transcripción en una línea celular de cáncer³⁴.

Mycobacterium tuberculosis, el agente causal de la tuberculosis, es un patógeno intracelular obligado que principalmente reside en macrófagos del huésped. En modelos de cultivos celulares el exceso de hierro incrementa notablemente el crecimiento de la micobacteria. De modo que es evidente que la modulación del hierro en el huésped impacta al crecimiento intracelular de patógenos y la Ferroportina juega un papel central en este proceso³³

3.4. Proteínas Fur

La concentración de hierro en el interior de la célula debe ser regulada con la finalidad de mantener la viabilidad celular de la bacteria. En bacterias, el metabolismo del hierro está controlado por dos proteínas metaloreguladoras: La toxina diftérica (DtxR) y el regulador de la captación de hierro (Fur)³⁶. La caracterización funcional de la proteína represora dependiente de hierro (IdeR) en MAP, un miembro de la familia DtxR, mostró no solo tener control sobre la síntesis de micobactina (mbt) sino también regular la transcripción de genes involucrados en la adquisición de hierro (mbtB), almacenamiento de hierro (bfrA) y estrés oxidativo³⁷.

Por otro lado, las proteínas Fur han sido ampliamente estudiadas en diversas bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Dentro de las proteínas Fur se incluyen diversas proteínas metaloreguladoras, Fur (Fe²⁺), Zur (Zn²⁺) y Mur (Mn²⁺)³⁸. Al día de hoy, dos miembros de la familia Fur han sido caracterizados en MAP: Las proteínas FurA o proteínas Per (Peroxidasa de respuesta al estrés) y proteínas FurB o proteínas Zur (Represor de la captación de Zinc)³⁶.

La proteína reguladora de la absorción férrica conocida como Fur (Ferric Uptake Regulatory) se encarga de la regulación de una gran variedad de genes, en respuesta a los niveles intracelulares de hierro, como se ha observado en *Escherichia coli*, en donde Fur regula diversos genes, incluyendo aquellos encargados de la captación del hierro. Se ha mostrado también que Fur regula otros genes que no están directamente relacionados con el hierro, tal como los que codifican para hemolisina, toxinas y superóxido dismutasas entre otros³⁹.

La proteína Fur es una pequeña proteína reguladora con una masa molecular de 15 a 17 kDa y aproximadamente 150 aminoácidos, que se ha conservado a través de un amplio rango de especies bacterianas³⁰. Se ha propuesto que la proteína Fur funciona como un dímero que utiliza Fe (II) como cofactor, al observarse que varios miembros representativos de la familia Fur requieren unir a un ion metálico divalente, Fe²⁺ o Mn²⁺ para activar su unión al ADN^{36,39}. Fur contiene 12 residuos de Histidina y 4 residuos de Cisteína, los cuales han sido identificados como probables candidatos para la coordinación de la proteína con el metal, sin embargo, el sitio de unión del metal en Fur es aún controversial^{30,39}.

Ensayos utilizando el promotor de aerobactina de *E. coli* definieron una secuencia palindrómica rica en A/T de 19 pares de bases, 5´GATAATGATAATCATTATC3´, como la caja de hierro o caja Fur utilizada por la proteína Fur para regular este operón. Ensayos de alineamientos de secuencias de una colección de más de 30 promotores controlados por hierro, de varios orígenes, confirmó que esta secuencia consenso era el blanco funcional que la proteína Fur emplea para unirse a los promotores de los genes que regula^{27,40}.

Los promotores de genes para la captación de hierro son negativamente regulados por Fur. A altas concentraciones de hierro los genes son reprimidos, mientras que una baja concentración de hierro en el medio anula la represión. Basado en evidencias de ensayos acoplados de transcripción y traducción in vitro se ha propuesto que la proteína metaloreguladora (Fur) actúa como un clásico regulador en el cual Fe (II) es requerido como cofactor para la unión al ADN³⁹.

Un modelo simplificado del mecanismo más común, encontrado en proteínas Fur, consiste en su unión específica a las cajas Fur, encontradas en los promotores de su ADN blanco utilizando un cofactor metálico como correpresor. La coordinación con este correpresor causa un cambio conformacional en el regulador, que promueve y estabiliza su interacción con el ADN⁴⁰.

La represión clásica de hierro unido a Fur propone que a medida que el hierro comienza a incrementar su disponibilidad en la célula bacteriana, el cofactor Fe (II) se une a monómeros de la proteína Fur, y este monómero unido a hierro dimeriza. El dímero Fur unido a hierro reprime la transcripción uniéndose a la caja Fur en su promotor blanco y bloqueando la unión de la RNA polimerasa evitando la transcripción de los genes relacionados³⁰. Sin embargo, otras acciones y mecanismos de regulación han sido propuestos.

Actualmente, *H. pylori* es único en la utilización de Fur como un represor aun cuando hay ausencia de Fe (II) como cofactor, este fenómeno se conoce como regulación por apo-Fur. Bajo condiciones de agotamiento de hierro, Fur se encuentra en su forma apo-Fur, en esta forma Fur se une a la caja de hierro de su promotor blanco. Esa unión bloquea la unión de la RNA polimerasa, por lo tanto, la transcripción es reprimida³⁰.

En MAP se ha observado que las proteínas Fur tienen la capacidad de unirse a la región promotora y bloquear la transcripción de genes relacionados con la regulación del hierro en condiciones de concentración elevada este metal, sin embargo, también se ha revelado evidencia que indica que en ausencia de hierro intracelular las proteínas Fur también se pueden unir a genes blanco siguiendo una apo-regulación⁴¹.

3.5. Proteína MAP3773c

El genoma de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* posee una serie de polimorfismos de secuencia larga (LSP), de los cuales LSP15 de 5.4Kb codifica varios genes involucrados en sistemas de captación de metales¹². Estos sistemas incluyen a la proteína tipo Fur MAP3773c, una metaloproteína capaz de regular transcripcionalmente la homeostasis de metales en bacterias^{41,42}.

Ensayos realizados en cepas MAP K10 han mostrado que las proteínas Fur tienen la capacidad de unirse a genes dentro del genoma de MAP implicados en diversas funciones, como son: Síntesis de pared células, metabolismo energético, respiración y regulación transcripcional y traduccional³⁸. A través del uso de análisis computacional se ha logrado identificar 23 vías probablemente reguladas por MAP3773c y que están involucradas en la respiración, metabolismo y virulencia de la mycobacteria⁴¹.

Localizado entre los nucleótidos 4,216,834 - 4,217,253, map3773c es un gen de 420 pares de bases, que codifica una proteína de 139 aminoácidos que se organizan en una estructura 50% hélice alfa^{38,43}.

La proteína MAP3773c de un peso molecular teórico de 16,229 KDa, aunque se han encontrado formas de aproximadamente 17 KDa y 20 KDa³⁸. La proteína ha mostrado capacidad de unirse a secuencias específicas de ADN y actuar como factor de transcripción, al reconocer la denominada caja Fur de 19 pares de bases, para lo cual requiere la unión de un ion metálico divalente para su unión al ADN^{38,41}.

MAP3773c reconoce diversos sitios dentro del genoma de MAP tanto en condiciones de disponibilidad de hierro como en deficiencia del metal⁴⁴.

Los genes map3736c y map3638c asociados a la regulación del hierro en MAP son capaces de unir la proteína Fur MAP3773c cuando el hierro intracelular está agotado en la bacteria⁴¹. Ensayos realizados en MAP K-10 con delección en el gen map3773c permitieron identificar el importante papel que cumple la proteína MAP3773c incluso en condiciones de deficiencia de hierro, en donde la falta de esta proteína ocasiona en MAP la pérdida de la regulación en varias vías, incluidas aquellas relacionadas con la respiración celular y el metabolismo, sistemas de absorción y secreción de metales, síntesis de pared celular, virulencia y patogenicidad⁴⁴.

Además de su función como una proteína Fur, diversos estudios realizados por Landeros-Sánchez y cols. proponen una función tipo Zur (FurB) en la proteína MAP3773c. Los alineamientos de estructura realizados con la proteína MAP377c presentaron un 34% de similitud en su forma monomérica con la proteína FurB de *M. tuberculosis*. Por otro lado la MAP3773c fue reconocida por anticuerpos anti-FurB de *Anabaena*, con lo que se sugiere que la función de MAP3773c podría estar asociada a la de una proteína FurB³⁸.

Las proteínas FurB regulan genes asociados al metabolismo del zinc y aquellos que regulan la respuesta al estrés oxidativo³⁶. Estos estudios revelaron además que las cisteínas en la posición 91, 94, 131 y 134 de la cadena de aminoácidos interactúan con Zinc atómico. A través de ensayos de electroforesis SDS-PAGE se evidenció la participación del Zinc en la oligomerización de MAP3773c, en donde el metal tiene un efecto estabilizador de trímeros de la proteína en condiciones reductoras³⁸.

Por otro lado, diversos experimentos en células epiteliales (MAC-T) evidenciaron que la falta de LSP15 impide la habilidad de MAP para invadir y sobrevivir en el interior de las células. Shoyama y cols. observaron una regulación positiva (sobreexpresión) de MAP3773 en células epiteliales, sus resultados sugieren que mientras la célula huésped

crea un ambiente hostil limitando la disponibilidad de hierro, MAP utiliza MAP3773c para controlar la homeostasis del hierro e incrementar sus oportunidades de sobrevivir³⁶.

IV. JUSTIFICACION

La paratuberculosis bovina, también conocida como enfermedad de Johne, representa un impacto económico sobre todo para el sector pecuario debido a las grandes pérdidas que representa en ganado y productos alimentarios derivados del mismo, sin ignorar el riesgo sanitario que MAP representa al estar asociada a enfermedades que afectan la salud del ser humano. Aunque se ha reunido suficiente evidencia que documenta el comportamiento de MAP durante el proceso infeccioso y los mecanismos que emplea para su supervivencia, los mecanismos de regulación relacionados con la homeostasis del hierro a través de proteínas FUR aún continúan en investigación y muchas de las funciones de las proteínas Fur aun no son del todo esclarecidas.

Nuestro equipo de trabajo cuenta con evidencia que sugiere la proteína MAP3773c, expresada en este patógeno, puede cumplir una función reguladora de proteínas asociadas al metabolismo del hierro dentro del macrófago, tal es el ejemplo de la Ferroportina. El estudio de estos mecanismos a nivel molecular y su uso como factores de patogenicidad y supervivencia de MAP nos permitirá definir las bases para idear nuevos blancos farmacológicos, que hagan posible el desarrollo de nuevos métodos de prevención y tratamiento de MAP que a la fecha no existen comercialmente.

V. HIPOTESIS

La proteína MAP3773c se une a la región codificante de Ferroportina 1

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar la interacción de la proteína MAP3773c con la región codificante del gen de Ferroportina 1 en macrófagos de ratón J774 A.1 transfectados con el vector *pcDNA3.1-map3773c*, por medio de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

VII. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar cultivos de macrófagos J774 A.1 de ratón.
- Realizar transfecciones en macrófagos J774 A.1 con el vector *pcDNA3.1-map3773c*.
- Comprobar la expresión de la proteína MAP3773c en los macrófagos transfectados por la técnica de Western blot.
- Realizar Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) en los macrófagos tratados.
- Amplificar fragmentos de ADN unidos a la proteína por PCR.

VIII. MATERIALES Y METODOS

8.1. Cultivo de macrófagos J774 A.1 de ratón.

La línea celular de macrófagos J774 A.1 aislada de células reticulares de ratón Balb/c, se mantuvo en medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y Gentamicina (50 µg/ml), en incubación a 37°C y atmosfera de CO₂ al 5%.

8.2. Tratamiento de macrófagos J774 A.1 de ratón

Diseño experimental

		Tratamiento de macrófagos		
		No transfectados	Transfectados	Transfectados con hierro
Tiempo de cultivo	6 horas	Macrófagos no transfectados, 6 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, 6 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, en cultivo con hierro, 6 horas de cultivo
	12 horas	Macrófagos no transfectados, 12 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, 12 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, en cultivo con hierro, 12 horas de cultivo
	24 horas	Macrófagos no transfectados, 24 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, 24 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, en cultivo con hierro, 24 horas de cultivo
	48 horas	Macrófagos no transfectados, 48 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, 48 horas de cultivo	Macrófagos transfectados, en cultivo con hierro, 48 horas de cultivo

Transfección de macrófagos J774 A.1 con el vector pcDNA3.1-map3773c.

1. Las células de cultivo en botellas T75 al 80% de confluencia fueron lavadas con 5 ml de PBS 1X estéril, levantadas con scraper, aspiradas con 5 ml de medio de cultivo

DMEM suplementado (10% SFB, 50 µg/ml Gentamicina) y colocadas en un tubo falcón por cada 3 botellas de cultivo empleadas.

2. Cada tubo se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos para lavar el pellet celular descartando el medio de cultivo y resuspendiendo en medio nuevo suplementado.
3. De cada tubo se tomaron 10 µL para su cuantificación con azul tripán en hemocitómetro.
4. Las células se colocaron en botellas para cultivo con medio DMEM suplementado (10% SFB, 50 µg/ml Gentamicina) en incubación a 37°C y atmosfera de CO₂ al 5%.
5. Para realizar la transfección de macrófagos con el vector conteniendo el gen map3773c se empleó la técnica de lipofectamina con el kit HiPerFect Transfection Reagent Handbook de QIAGEN® siguiendo las indicaciones del fabricante:
Por cada 2x10⁶ células vivas se preparó una solución de 375 ng de plásmido pcDNA3.1-map3773c diluidos en 100 µL de medio de cultivo para una concentración de 50nM de plásmido, y 6 µL de Hi-PerFect fact Transfection Reagent mezclando por inversión.
6. La solución se dejó incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente y se agregó por goteo a las células en cultivo, dejando incubar hasta de 6 a 72 horas.

Tratamientos de macrófagos J774 A.1 en cultivos con hierro.

Se eligieron células transfectadas para realizar tratamientos con hierro agregando a las botellas de cultivo una solución 20 mM de FeNTA hasta lograr una concentración final de 400 nM en medio de cultivo.

8.3. Western blot

Lisis de macrófagos y cuantificación proteica de los extractos.

1. Se emplearon 100 µL de cultivo celular en cada uno de los tratamientos para extracción y cuantificación de proteína, centrifugando a 6500 rpm durante 5 minutos.
2. Luego de descartar el sobrenadante, se agregaron 8 µL de búfer de lisis al pellet celular y se vortexearon las muestras durante 5 segundos, 5 veces.
3. Las muestras se colocaron en hielo durante 15 minutos.

4. La suspensión se centrifugó a 8×10^3 rpm, 5 min, a 4°C y se recuperó el sobrenadante correspondiente al extracto de proteínas totales.
5. Se tomaron 50 μL de cada extracto y se cuantificó proteína total por el método de Bradford, añadiendo a cada tubo 200 μL del reactivo y 750 μL de agua libre de nucleasas.
6. Las muestras se analizaron por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 595 nm para finalmente determinar la concentración de proteína en cada muestra.

Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) para los extractos proteicos de lisado de macrófagos en cada uno de los tratamientos, en gel de poliacrilamida al 10% para cámara chica por duplicado.

1. Los geles se colocaron en cámara chica y se cubrieron con buffer de electroforesis.
2. En el primer pocillo de cada gel se colocaron 10 μL de marcador de peso molecular para proteínas.
3. En los siguientes pocillos se cargaron 15 μL de los lisados correspondientes a cada tratamiento mezclados con 15 μL de buffer de carga.
4. La electroforesis se dejó correr en el gel durante 60 minutos a 100 V.
5. El primer gel obtenido de cada duplicado se mantuvo por 4 horas cubierto en tinción de Coomassie y agitación constante. Pasado el periodo de tinción, se enjuagó el gel con suficiente agua destilada.
6. Posteriormente se cubrió con solución decolorante, manteniéndose en agitación constante durante 3 horas, cambiando el decolorante en 3 ocasiones.

Electrotransferencia

1. Previo a la electrotransferencia se colocó una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) en metanol durante 10 segundos, se enjuago con agua destilada y posteriormente con buffer de electrotransferencia.
2. El segundo gel obtenido de cada duplicado de electroforesis fue colocado en un casete para electrotransferencia de cara a la membrana de PVDF entre hojas de papel filtro humedecido con buffer de electrotransferencia, evitando en todo momento la formación de burbujas de aire entre las membranas.

3. El casete conteniendo la membrana y el gel se montó en cámara para electrotransferencia y se cubrió con suficiente buffer de electrotransferencia. Se dejó correr la electrotransferencia a 100 V durante 60 minutos en agitación constante.
4. Terminado el tiempo de electrotransferencia se desmontó el casete, y la membrana de PVDF se lavó durante 5 minutos con TBS en agitación, 2 veces.

Incubación con anticuerpos y revelado.

1. Posterior a la electrotransferencia la membrana de PVDF se cubrió con solución de bloqueo al 5% durante 1 hora a 37°C para posteriormente lavarse con solución de bloqueo al 0.5% durante 5 min. 3 veces.
2. Se dejó incubar la membrana a 37°C en agitación constante durante una hora, expuesta a una dilución 1:16 de anticuerpo primario Anti-MAP3773c de conejo diluido en solución de bloqueo al 0.5%
3. Pasado el periodo de incubación se retiró la dilución de anticuerpos y se lavó la membrana de PVDF con solución de Tween 20 al 0.1% durante 10 minutos en agitación constante 3 veces.
4. La membrana lavada se expuso a una dilución 1:3000 de anticuerpos secundarios (Anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa) en solución de bloqueo al 0.5% y se mantuvo durante 60 minutos en agitación constante a 37°C.
5. Pasado el periodo de incubación, la membrana se lavó con Tween 20 al 0.1% por 10 minutos, 3 veces.
6. La membrana incubada con los anticuerpos se expuso a la solución sustrato de aminoetilcarbazol (AEC) hasta observar la aparición de bandas color rojo o marrón. Posteriormente la solución sustrato se descartó y se lavó la membrana con suficiente agua destilada.

8.4. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Las células transfectadas fueron analizadas por la técnica de inmunoprecipitación de cromatina *PierceTM Agarose ChIP Kit de Thermo Scientific*, siguiendo las indicaciones del fabricante que se describen a continuación:

8.4.1 Reticulación y Aislamiento del pellet celular.

1. A cada botella de cultivo celular conteniendo medio de cultivo se le añadió el volumen suficiente de una solución de formaldehído al 16% hasta obtener una concentración

final de formaldehído al 1% en el medio de cultivo. Se mezcló suavemente la botella y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.

2. Posteriormente se agregó a cada botella el volumen suficiente de una solución de glicina 2.5 M para una concentración final de glicina 0.125 M. Se mezcló cada botella y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se aspiró el medio de cultivo conteniendo formaldehído y se lavaron las células 2 veces con PBS helado.
4. Las células fueron raspadas y levantadas de las botellas con una dilución del Halt Cocktail con inhibidores de proteasas y fosfatasa en PBS (10 µg/ml).
5. Se realizó la cuantificación de las células vivas obtenidas con azul tripán y se alicuotaron 2×10^6 células por microtubo.
6. Finalmente fueron centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm para remover el sobrenadante. Los pellets celulares se almacenaron a -80°C hasta su uso.

8.4.2. *Lisis y Digestion con MNasa*

1. Los pellets celulares previamente almacenados a -80°C fueron descongelados en hielo.
2. A cada microtubo conteniendo 2×10^6 células se añadió 100 µL de buffer de lisis 1, que contiene inhibidores de proteasa, se resuspendió e incubó en hielo por 10 minutos.
3. Se centrifugaron los tubos a 9000 rpm por tres minutos, se removió el sobrenadante y se resuspendieron los núcleos en 100 µL de solución de trabajo con buffer de digestión de MNasa.
4. Se añadieron 0.25 µL de nucleasa microcócica (10 u/µL), se vortexeó el tubo e incubó en baño de agua a 37°C por 15 minutos, mezclando por inversión cada 5 minutos.
5. Se agregó 10 µL de solución stop de MNasa para detener la reacción, se vortexeó brevemente e incubó en hielo por 5 minutos.
6. Para recuperar los núcleos se centrifugó cada tubo a 9000 rpm por cinco minutos y se removió el sobrenadante.
7. Finalmente, se resuspendieron los núcleos en 50 µL de Buffer de lisis 2 que contiene inhibidores de proteasa y fosfatasa, se incubó en hielo cada tubo por 15 minutos, vortexeando por 15 segundos cada 5 minutos.
8. Se centrifugó a 9000 rpm por 5 minutos cada tubo y se recuperó el sobrenadante conteniendo la cromatina digerida a un nuevo tubo de 1.5 ml.

8.4.3 Inmunoprecipitación

1. De cada tubo correspondiente a cada tratamiento se separaron 5 μ L del sobrenadante que contiene la cromatina digerida en un tubo de 1.5 ml y se almacenó a -20°C . Este es el 10% del total de la muestra de un ChIP que funciona como "input control".
2. A cada tubo conteniendo los 45 μ L remanentes del sobrenadante se le añadió 450 μ L de Buffer de dilución IP 1X.
3. Para cada Inmunoprecipitación se añadió el sobrenadante diluido a una columna de centrifugado tapada y se agregó el anticuerpo primario. Las cantidades de anticuerpos empleadas para cada tratamiento de 2×10^6 macrófagos se indican a continuación:
 - IP blanco: Para cada tratamiento los tubos correspondientes al blanco fueron tratados con 10 μ L de anticuerpo de conejo anti-MAP3373c por columna.
 - Control IP positivo: Para cada tratamiento los tubos correspondientes al control positivo fueron tratados con 10 μ L de Anticuerpos Anti-RNA polimerasa II por columna
 - Control IP negativo: Para cada tratamiento los tubos correspondientes al control negativo fueron tratados con 1 μ L de IgG de conejo normal por columna.
4. Cada una de las reacciones se dejó incubando toda una noche a 4°C sobre plataforma oscilante.
5. Posteriormente a cada columna de reacción se añadió 20 μ L de Agarosa con proteína A/G grado ChIP Plus y se dejó incubar a 4° en plataforma oscilante.
6. Las columnas se colocaron destapadas en tubos de recolección de 2ml y se centrifugaron a 3000 rpm por 30 segundos. El flujo de cada columna descartado en el tubo de recolección fue desechado.
7. A cada columna tapada se le agrego 0.5 ml de buffer de lavado IP 1 y fueron colocadas en incubación 5 minutos a 4°C en plataforma oscilante.
8. El flujo de las columnas fue nuevamente descartado en los tubos recolectores por centrifugación 3000 rpm por 30 segundos.
9. Los pasos 7 y 8 de lavado se repitieron con el buffer de lavado IP 2 y posteriormente con el buffer de lavado IP 3.
10. Para remover los residuos de buffer de lavado las columnas se insertaron en los tubos de recolección y se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto.

8.4.4. Elución

1. A cada columna tapada conteniendo la resina lavada se le añadieron 150 μL del buffer de elución IP 1X y se dejó incubar a 65°C con 40 minutos agitando los tubos cada 10 minutos.
2. Se descongelaron los tubos conteniendo los 5 μL correspondientes al 10% de la cromatina de cada tratamiento y a cada uno de ellos se le agregó 150 μL de buffer de elución IP, 6 μL de NaCl 5M y 2 μL de Proteinasa K (20 $\mu\text{L}/\text{ml}$).
3. Luego del periodo de incubación las columnas abiertas se colocaron en tubos que contenían 6 μL de NaCl 5M y 2 μL de proteinasa K (20 mg/ml) y fueron centrifugadas 6000 rpm por 1 minuto.
4. Las columnas se descartaron y cada tubo de tratamiento incluyendo los tubos correspondientes al 10% de cada tratamiento fueron colocados en incubación a 65°C durante 1.5 horas.

8.4.5. Recuperación del ADN.

1. Cada tubo conteniendo las muestras eluidas de la inmunoprecipitación y el 10% de los tratamientos se les añadió 750 μL de buffer de unión a ADN.
2. Todos los tratamientos conteniendo buffer el buffer de unión a ADN se hicieron pasar por columnas de purificación de ADN insertadas en tubos de recolección, centrifugando las columnas a 10000 rpm por 1 minuto para desechar el flujo.
3. Posteriormente se agregó a cada columna 750 μL del buffer de lavado de columna de ADN. Las columnas se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto descartando el flujo.
4. Centrifugó una vez más cada columna a 10,000 rpm por 2 minutos para descartar completamente el flujo y se colocó cada una en un tubo de recolección nuevo.
5. Se pipeteó 50 μL de la solución de elución de ADN directamente en el centro de cada columna
6. Se centrifugaron las columnas a 10,000 rpm por 2 minutos, se descartaron las columnas y la solución resultante correspondiente al ADN purificado se almacenó a -20°C.

8.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PUNTO FINAL

Diseño de oligonucleótidos “primers”

- *Oligonucleótidos para gen fpn1 (Ferroportina de ratón)*
Forward 5- GAGCTCCATTACAGAAACAAGTTTTT -3
Reverso 5- ATACACACATTACTGTAATA -3
- *Oligonucleótidos para gen de actina (Control positivo)⁴⁵*
Forward 5- GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG -3
Reverso 5- CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T -3

PCR y Electroforesis

Se prepararon reacciones (PCR) de 25 µL para cada tratamiento incluyendo en cada uno el 10% de la muestra, control positivo y control. negativo de ChIP.

Las reacciones se prepararon mezclando el EmeraldAmp® GT PCR Master Mix, agua libre de nucleasas, los oligonucleótidos y muestras correspondientes en las cantidades que se señalan a continuación:

Mezcla	Cantidad (µL)
Master Mix	12.5
Cebadores	3
ADN	5
Agua libre de nucleasas	4.5

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *T100 Thermal Cycler de BioRad* en las siguientes condiciones: 95°C 10 min, 54.5°C 30 seg y 72°C 45 seg para los controles positivos y 95°C 10 min, 56°C 30 seg y 72°C 45 seg para el resto de las reacciones por 35 ciclos.

20 µL de cada muestra de ADN amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% a 100 V durante 50 minutos. El gel tiñó con bromuro de etidio para observar las bandas de ADN empleando un 5 µL de marcador de peso molecular en escalera de 1000pb.

IX. RESULTADOS Y DISCUSION

WESTERN BLOT

Las imágenes muestran las proteínas presentes en la membrana reveladas con aminoetilcarbazol luego de la incubación con el anticuerpo primario Anti-MAP3773c de conejo.



FIG 1.A.- Western blot de extracto proteico de macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 6 horas post-Transfección. 1) Marcador de peso molecular, 2) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 3) Macrófagos sin transfectar, 4) Macrófagos transfectados con neomicina, 5) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1, 6) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c y hierro 400nM.

Los extractos proteicos de macrófagos transfectados con el vector pcDNA3.1-map3773c, con y sin hierro, fueron analizados con la técnica de Western blot para evaluar la expresión de la proteína MAP377c luego de 6, 12, 24 y 48 horas de incubación posterior a la transfección. En las imágenes se observa el resultado en las membranas de PVDF para cada tratamiento, en los cuales se incluyeron macrófagos sin transfectar y macrófagos transfectados únicamente con el vector pcDNA3.1 sin el gen como controles negativos.

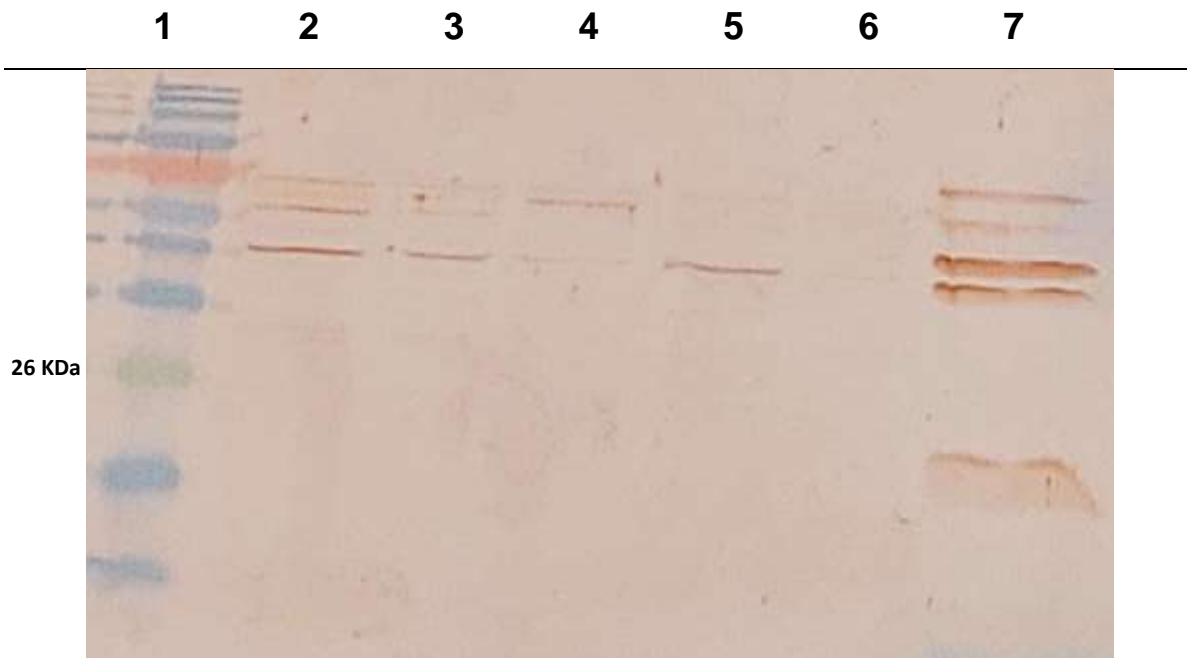


FIG 1.B.- Western blot de extracto proteico de macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 12 horas post-Transfección. 1) Marcador de peso molecular, 2) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 3) Macrófagos sin transfectar, 4) Macrófagos transfectados con neomicina, 5) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1, 6) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c y hierro 400nM.

Los resultados muestran, en cada uno de los tratamientos, una banda de aproximadamente 20 KDa (justo por debajo de la banda verde del MPM) en el carril numero 7 el cual corresponde a los extractos de macrófagos transfectados con el vector pcDNA3.1-map3773c incubados en presencia de hierro. En el resto de los carriles no se observa la presencia de proteína de este peso molecular, incluyendo los controles negativos.

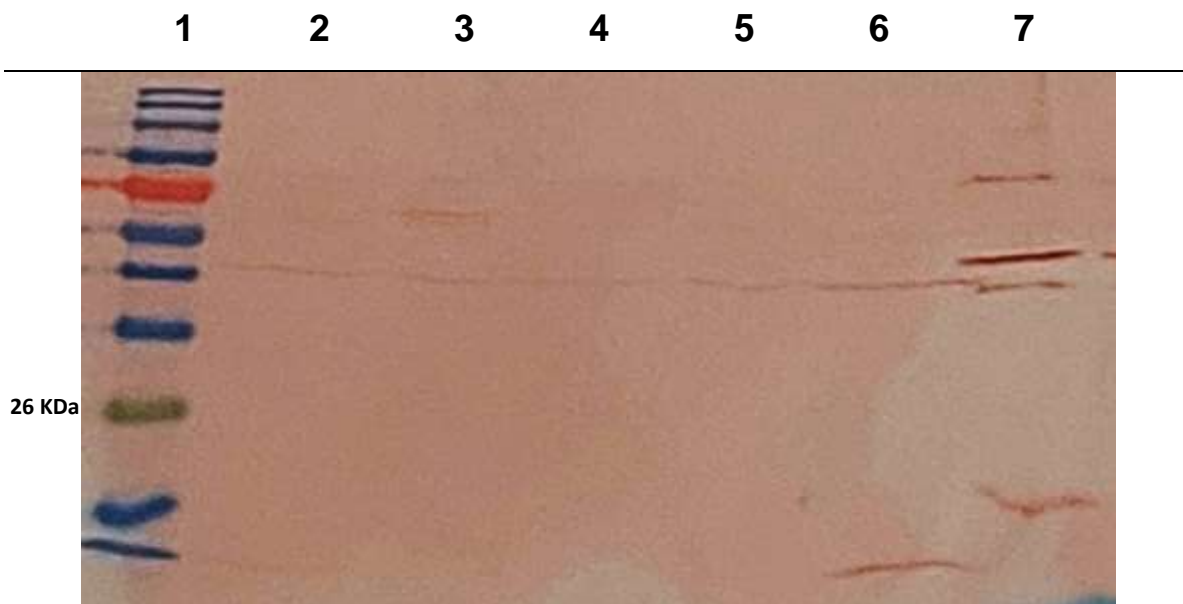


FIG 1.C.- Western blot de extracto proteico de macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 24 horas post-Transfección. 1) Marcador de peso molecular, 2) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 3) Macrófagos sin transfectar, 4) Macrófagos transfectados con neomicina, 5) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1, 6) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c y hierro 400nM.

Es notable que la banda más intensa que refleja una mayor expresión de la proteína MAP3773c se observa a las 24 horas post-infección (**Fig.1-C**)

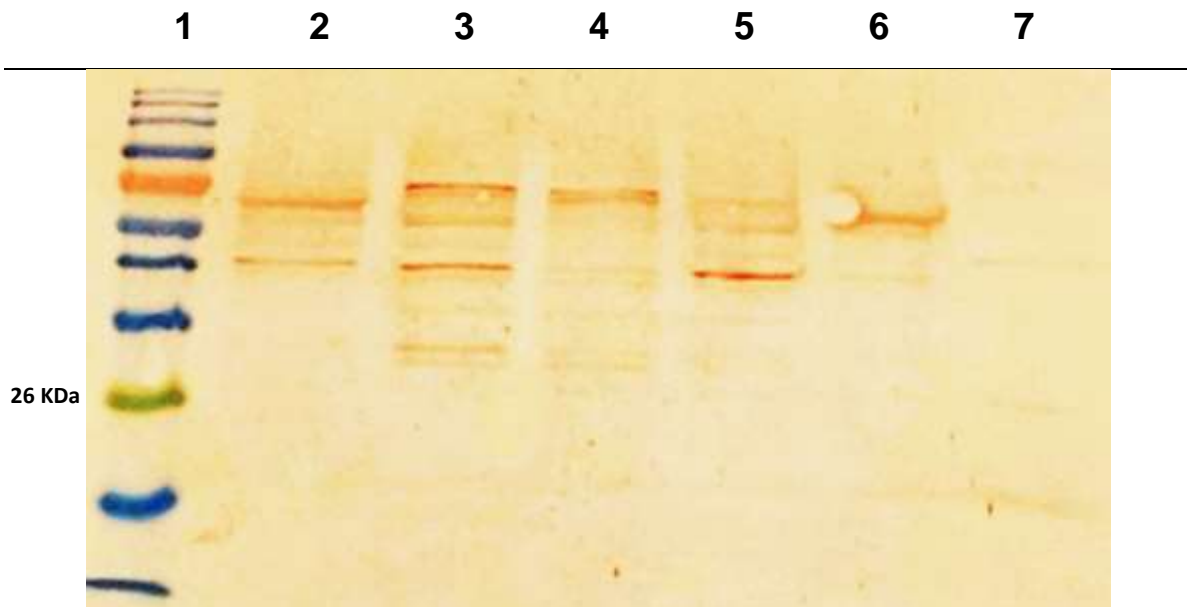
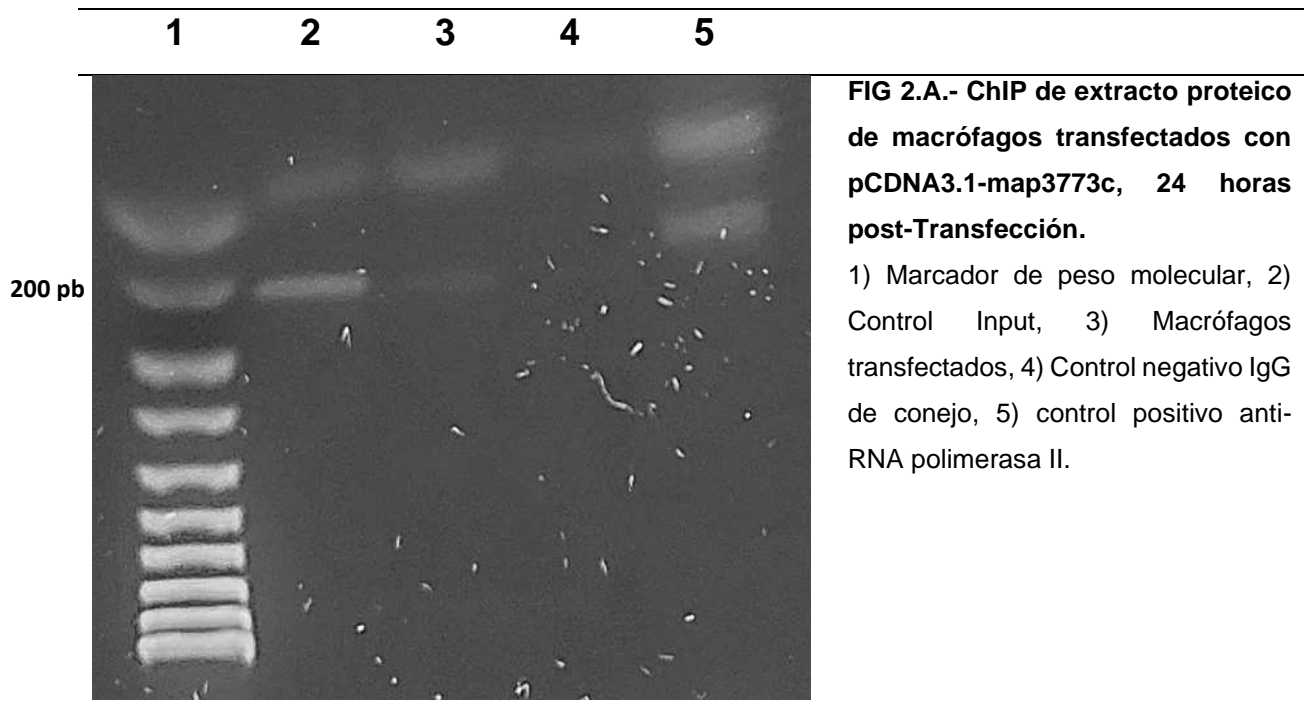


FIG 1.D.- Western blot de extracto proteico de macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 48 horas post-Transfección. 1) Marcador de peso molecular, 2) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c, 3) Macrófagos sin transfectar, 4) Macrófagos transfectados con neomicina, 5) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1, 6) Macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c y hierro 400nM.

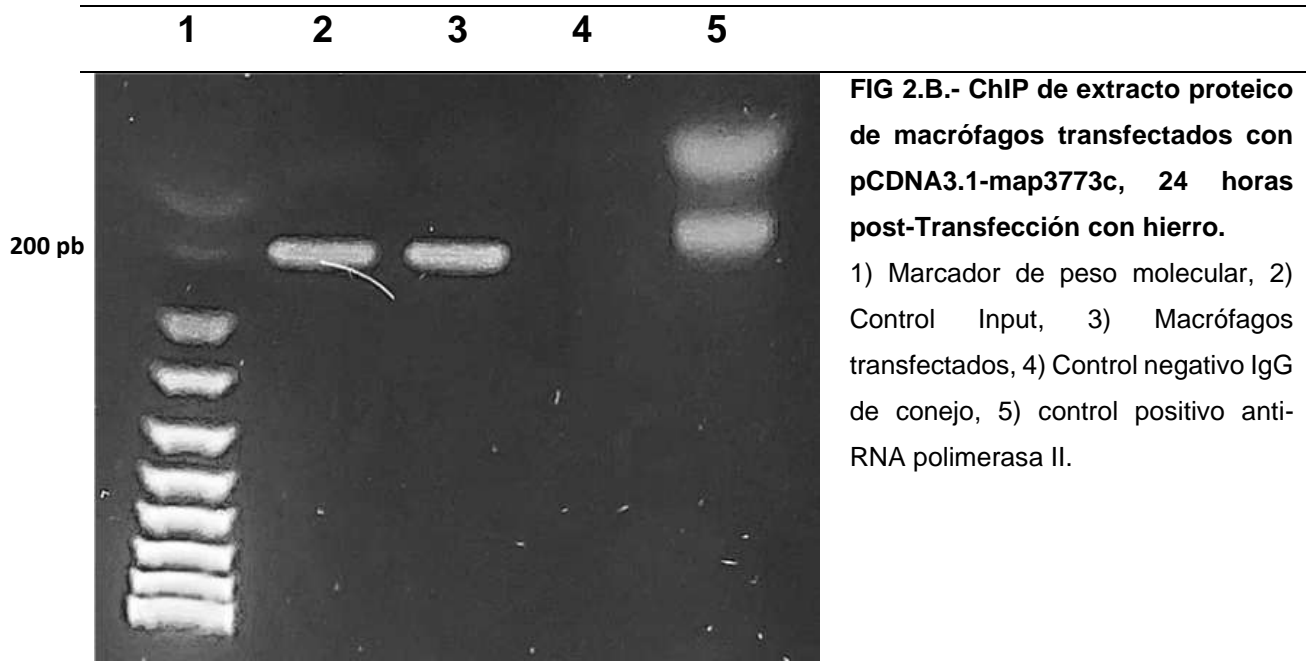
INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Las imágenes muestran los fragmentos amplificados (PCR) de la cromatina de macrófagos transfectados con pCDNA3.1-map3773c tratados por la técnica de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

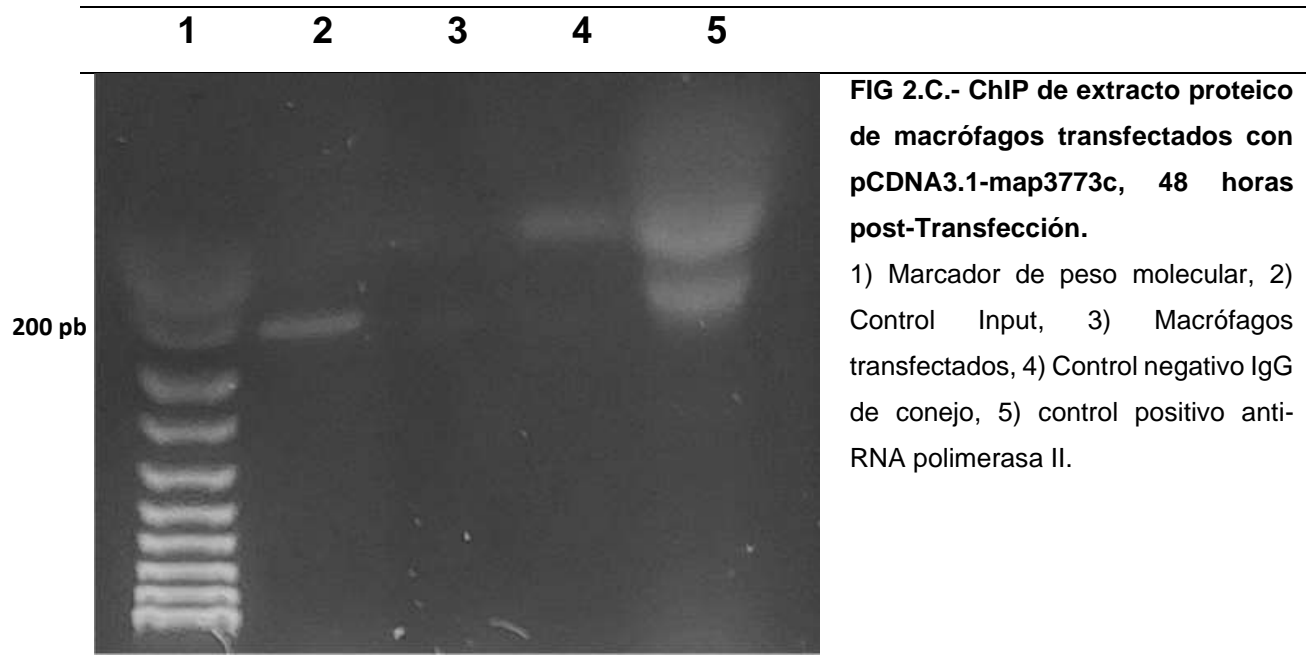


En cada uno de los tratamientos se buscó amplificar el gen *fpn1* de Ferroportina con excepción de su control positivo en el que se buscó amplificar el gen de actina (tratamiento con anti-RNA polimerasa II) con los oligonucleótidos correspondientes (Carril 5).

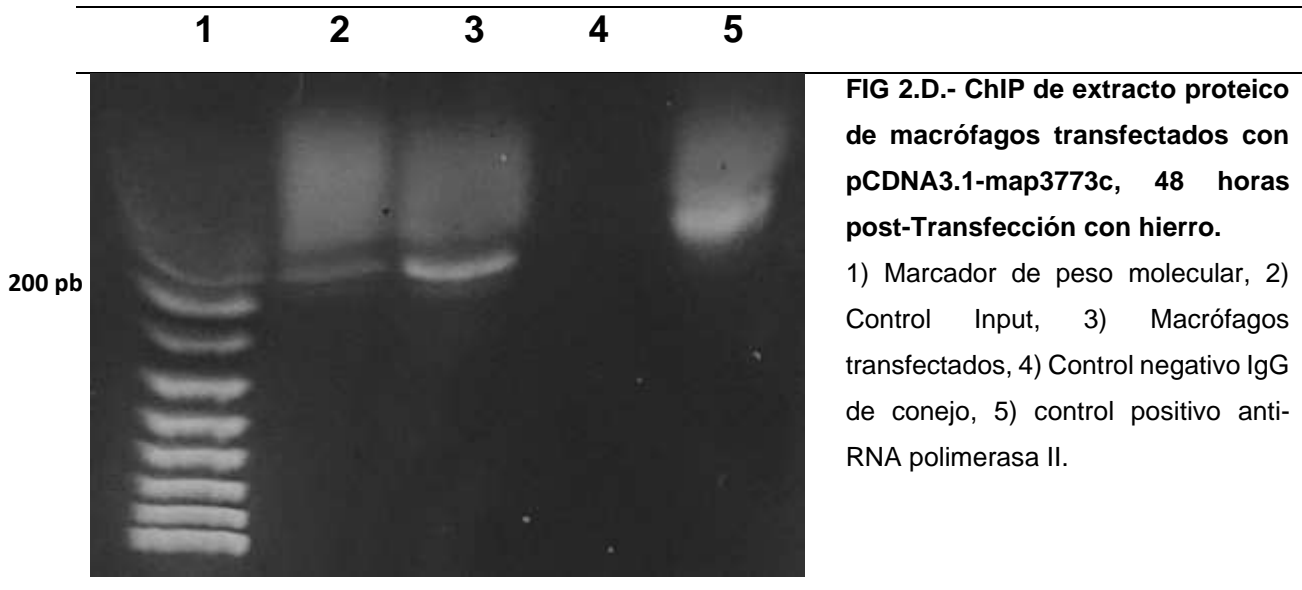
Los tratamientos fueron sometidos a un control negativo en el cual se empleó IgG de conejo durante el procedimiento de ChIP (Carril 4) y a un control interno positivo "input" en el que las muestras en la técnica de ChIP no se hicieron pasar por la columna con anticuerpos específicos (Carril 3).



Los resultados muestran la presencia de bandas de 200 pb, correspondientes al gen de Ferroportina, en los tratamientos ChIP de macrófagos transfectados con pcDNA3.1-map3773c en el control "input" de todos los tratamientos indicando la presencia del gen en las células utilizadas.



Sin embargo, la presencia de estas bandas en los tratamientos de las células transfectadas expuestas al anticuerpo primario anti-MAP3773c y seleccionadas en columnas con proteína A/G solo fue observada en los tratamientos con hierro a las 24 y 48 horas post transfección.



DISCUSIÓN

Los resultados observados en el análisis Western blot revelan que los macrófagos transfectados con el vector pcDNA3.1-map3773c son capaces de expresar, en cultivo, la proteína MAP3773c si hay presencia de hierro en el medio. Tomando como referencia que la expresión de proteína resultó con mayor intensidad en los tratamientos revelados 24 horas post transfección, se decidió partir de esa observación para el análisis de las células transfectadas por medio de la técnica de ChIP.

La técnica de ChIP nos permitió valorar por inmunoprecipitación en cromatina la interacción de la proteína MAP3773c, en la cromatina de *fpn1* de macrófago de ratón.

Los resultados revelan en primer lugar la presencia del gen en los macrófagos empleados, mediante la amplificación específica de *fpn1* con los oligonucleótidos diseñados (input).

Los resultados de la técnica de ChIP, se revelaron con la amplificación de una región del gen de *fpn1* mostrando la presencia del gen en las muestras expuestas al anticuerpo específico anti-MAP3773c. Estos resultados evidencian la unión específica de la proteína

MAP3773c a un fragmento de la región codificante en el gen de Ferroportina, en presencia de hierro.

Tal como se pudo observar en los resultados de Western blot, la presencia del hierro juega un papel importante en la expresión de la proteína en las células transfectadas, lo cual se ve reflejado en los resultados de ChIP en los que no se logró observar la inmunoprecipitación positiva en células tratadas en ausencia de hierro, aunque en el control de células transfectadas sin hierro se puede identificar una banda tenue de cromatina amplificada tanto a las 24 y 48 horas. Diversos estudios han revelado el papel del hierro como un importante cofactor que permite la polimerización y unión de proteínas Fur a secuencias específicas dentro de los genes que regula^{30,36,39}. Sin embargo, se requieren más estudios para elucidar el papel del hierro en la expresión del gen map3773c en células transfectadas. Resulta importante señalar que en este estudio se pudo encontrar una correlación entre la presencia del metal y la expresión de la proteína en macrófagos.

A través de las técnicas empleadas se logró evidenciar la unión de la proteína MAP3773c a la llamada caja Fur presente en la región codificante de Ferroportina. Los estudios de Shoyama sugieren que las proteínas Fur tienen la capacidad de regular la expresión de proteínas reguladoras de la concentración de hierro en el macrófago a favor de la supervivencia de MAP como patógeno intracelular^{36,41}. Sin embargo, los resultados obtenidos evidencian una regulación transcripcional en la región codificante del gen de fpn1 y no en el promotor, siendo este caso quizás el primer hallazgo de una regulación transcripcional a nivel de la elongación posiblemente en la FPN1.

X. CONCLUSIONES

Es importante comprender los mecanismos de patogenicidad en el estudio de microorganismos como *Mycobacterium avium* supsp. *paratuberculosis* que representan un problema de salud pública y que además tiene un impacto económico negativo en el sector ganadero.

Diversos países a nivel mundial enfrentan el mismo reto; la falta métodos de diagnóstico y tratamientos que frenen oportunamente la propagación de la enfermedad. México no es la excepción. Actualmente la eliminación y sacrificio de animales infectados es la alternativa más viable ante el carácter irreversible de la enfermedad en su etapa clínica, en la que usualmente logra ser diagnosticada. De esta manera, la prevención de la enfermedad es el arma más poderosa.

El análisis de las proteínas Fur, como un factor patogenicidad empleado por la micobacteria para garantizar su supervivencia dentro del macrófago en función de la disponibilidad de hierro, permite un mejor entendimiento de los mecanismos que contribuyen al establecimiento de la enfermedad.

La posibilidad de generar blancos terapéuticos que anulen la patogenicidad de la micobacteria abre una ventana de alternativas para el desarrollo de estrategias tanto preventivas como de diagnóstico, así como en el diseño de vacunas y fármacos que hagan posible el control y tratamiento de las enfermedades infecciosas ocasionadas por la bacteria.

Por otro lado, el estudio nuevos mecanismos de regulación de la transcripción La observación de nuevos mecanismos de regulación de la transcripción

XI. REFERENCIAS

1. Retamal M, P., Beltrán M, C., Abalos P, P., Quera P, R. & Hermoso R, M. Mycobacterium coli subsp. paratuberculosis y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis. *Rev. Med. Chil.* **139**, 794–801 (2011).
2. Stratmann, J. *et al.* A 38-Kilobase Pathogenicity Island Specific for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Encodes Cell Surface Proteins Expressed in the Host. *Infect. Immun.* **72**, 1265–1274 (2004).
3. Manning, E. J. B. & Collins, M. T. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* **20**, 133–150 (2001).
4. Rasmussen, P., Barkema, H. W., Mason, S., Beaulieu, E. & Hall, D. C. Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **104**, 3123–3143 (2021).
5. Li, L. *et al.* The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 12344–12349 (2005).
6. Sánchez-Villalobos, A. *et al.* Infección por mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis en un rebaño criollo limonero. *Rev. Científica* **19**, 555–565 (2009).
7. Vega-Manriquez, D. X. *et al.* Detección serológica de paratuberculosis en producciones familiares de bovinos y caprinos del altiplano potosino, México. *Ecosistemas y Recur. Agropecu.* **7**, 1–8 (2020).
8. Morales, J. V. V. RIESGO DE LA PARATUBERCULOSIS (Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis) EN EL APARATO REPRODUCTOR Y SEMEN DE CARNEROS PELIBUEY. en 1–92 (2018).
9. Id, R. O., Id, G. L. & Id, H. C. Seroprevalencia de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en bovinos sospechosos sacrificados en rastro de Sonora, México. *Abanico Vet.* **11**, 1–12 (2021).
10. Feliciano, M. aacute n S. *et al.* Prevalence and associated risk factors for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cattle in Mexico. *J. Vet. Med. Anim. Heal.* **7**, 302–307 (2015).
11. Rathnaiah, G. *et al.* Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Front. Vet. Sci.* **4**, 1–13 (2017).
12. Alexander, D. C., Turenne, C. Y. & Behr, M. A. Insertion and deletion events that define the pathogen Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *J. Bacteriol.* **191**, 1018–1025 (2009).
13. Rindi, L. & Garzelli, C. Genetic diversity and phylogeny of Mycobacterium avium. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 375–383 (2014).
14. Ramírez G, R. & Maldonado E, J. Evasión molecular de la activación del macrófago bovino por Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis. *Rev. MVZ Córdoba* **18**, 3897–3907 (2013).
15. Parrish, N., Vadlamudi, A. & Goldberg, N. Anaerobic adaptation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in vitro: similarities to M. tuberculosis and differential susceptibility to antibiotics. *Gut Pathog.* **9**, 34 (2017).
16. Cirone, K., Morsella, C., Romano, M. & Paolicchi, F. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: Presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. *Rev. Argent. Microbiol.* **39**, 57–68 (2007).
17. Buitrago-López, A., Castro-Forero, S., Fernández-Jiménez, M. & Pulido-Medellín, M. Paratuberculosis bovina, revisión de literatura. *Rev. Habitus Semilleros Investig.* **1**, e12434 (2021).
18. Chaubey, K. K. *et al.* Trends and advances in the diagnosis and control of paratuberculosis in domestic livestock. *Vet. Q.* **36**, 203–227 (2016).
19. Tobergte, D. R. & Curtis, S. Paratuberculosis (enfermedad de Johne). *Man. Terr. la OIE 2014* **53**, 1689–1699 (2021).
20. Dane, H., Koidis, A., Stewart, L. D. & Grant, I. R. Optimization of the composition of a solid culture medium for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using factorial design and response surface methodology. *J. Appl. Microbiol.* **132**, 4252–4265 (2022).
21. SENASICA. *Panorama Nacional de la Paratuberculosis.*

22. Corneli, S. *et al.* Early Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infected Cattle: Use of Experimental Johnins and Innovative Interferon-Gamma Test Interpretative Criteria. *Front. Vet. Sci.* **8**, 1–14 (2021).
23. Mc, M. & Mobarak, A. S. *PARATUBERCULOSIS EN CAPRINOS (Enfermedad de Johne)*.
24. Agrawal, A. *et al.* Gold nanoparticle based immunochromatographic biosensor for rapid diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection using recombinant protein. *J. Microbiol. Methods* **177**, 106024 (2020).
25. Gual, B. & Pablo, J. Actualización Bibliográfica: Diagnóstico y Control de la Paratuberculosis. *Fac. Ciencias Vet. - UNCPBA* (2020).
26. University, I. S. Paratuberculosis. Enfermedad de Johne. *Cent. food Secur. public Heal.* 1–8 (2007).
27. De Lorenzo, V., Escolar, L. & Pérez-Martín, J. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J. Bacteriol.* **181**, 6223–6229 (1999).
28. Ganz, T. Cellular iron: Ferroportin is the only way out. *Cell Metab.* **1**, 155–157 (2005).
29. Chantes Guerra, A., Negrete Abascal, E., Vaca Pacheco, S., Sánchez Alonso, P. & Vázquez Cruz, C. El hierro, elemento metálico importante en la vida y en los procesos infecciosos. *Elem.* **85** 41–48 (2012).
30. Carpenter, B. M., Whitmire, J. M. & Merrell, D. S. This Is Not Your Mother's Repressor: the Complex Role of Fur in Pathogenesis. *Infect. Immun.* **77**, 2590–2601 (2009).
31. Troxell, B. & Hassan, H. M. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 1–13 (2013).
32. Ward, D. M. & Kaplan, J. Ferroportin-mediated iron transport: Expression and regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 1426–1433 (2012).
33. Johnson, E. E., Sandgren, A., Cherayil, B. J., Murray, M. & Wessling-Resnick, M. Role of Ferroportin in Macrophage-Mediated Immunity. *Infect. Immun.* **78**, 5099–5106 (2010).
34. Xue, D. *et al.* Nuclear transcription factor Nrf2 suppresses prostate cancer cells growth and migration through upregulating ferroportin. *Oncotarget* **7**, 78804–78812 (2016).
35. Beaumont, C. Multiple regulatory mechanisms act in concert to control ferroportin expression and heme iron recycling by macrophages. *Haematologica* **95**, 1233–1236 (2010).
36. Miyagaki Shoyama, F. CHARACTERIZATION OF MAP3773C, FERRIC UPTAKE REGULATOR PROTEIN, IN IRON METABOLISM OF MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS. 1–125 <https://d.lib.msu.edu/etd/49461> (2020).
37. Janagama, H. K. *et al.* Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Microbiology* **155**, 3683–3690 (2009).
38. Hernández-Guevara, E. *et al.* In Silico and In Vitro Analysis of MAP3773c Protein from Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis. *Biology (Basel)*. **11**, 1183 (2022).
39. Althaus, E. W., Outten, C. E., Olson, K. E., Cao, H. & O'Halloran, T. V. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**, 6559–6569 (1999).
40. Fillat, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* **546**, 41–52 (2014).
41. Shoyama, F. M., Janetanakit, T., Bannantine, J. P., Barletta, R. G. & Sreevatsan, S. Elucidating the Regulon of a Fur-like Protein in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP). *Front. Microbiol.* **11**, 1–12 (2020).
42. Wang, J. *et al.* Iron Acquisition in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *J. Bacteriol.* **198**, 857–866 (2016).
43. GenBank Overview. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
44. Thapa, S. *et al.* The Fur-like regulatory protein MAP3773c modulates key metabolic pathways in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis under in-vitro iron starvation. *Sci. Rep.* **14**, 8941 (2024).
45. Veres-Székely, A. *et al.* Selective measurement of α smooth muscle actin: why β -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. *BMC Mol. Biol.* **18**, 12 (2017).

ANEXO I

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- Buffer de lisis
Base HBSS, 0.1 % SDS, PMSF 3 mM.
- Buffer de electroforesis
25 mM Tris, 250 mM Glicina, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3.
- Colorante Azul Coomassie R-250
0.25 g Colorante Azul Coomassie R-250 en 100 ml de solución decolorante (metanol: Ac. Acético)
- Decolorante para Azul Coomassie
500 ml metanol, 400 ml H₂O, 100 ml Ac. Acético glacial.
- Buffer de electrotransferencia
48 mM Tris Base, 39 mM Glicina, 20% Metanol, 0.0375% SDS, pH 9.2.
- Buffer TBS
50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl
- Solución de bloqueo al 5%
Buffer TBS + 5% de leche descremada en polvo
- Solución de bloqueo al 0.5%
Búffer TBS + 0.5 % de leche descremada en polvo
- Tween 20 al 0.1%
Buffer TBS + 0.1% v/v de tween 20
- Sustrato de Aminoetilcarbazol (AEC)
25 mg de Aminoetilcarbazol (AEC) en 2.5 mL de dimetilformamida (DMF) en 47.470 mL de búffer de acetatos y 30µL de H₂O₂ al 30 %.

Reactivos Pierce™ Agarose ChIP Kit 26156

- Agarosa con proteína A/G grado ChIP
- Buffer lavado/dilución IP (5X)
- Buffer de lavado IP3 (5X)
- Buffer de elución IP (2X)
- Cloruro de sodio (5M)
- Indicador de pH
- Solución de elución para columna de ADN
- Buffer de extracción de membrana

- Buffer de extracción nuclear
- Buffer de digestión con MNasa
- Solución “stop” de MNasa
- Halt™ Cocktel de inhibidores de proteasa y fosfatasa libre de EDTA (100X)
- Nucleasa Micrococcal grado ChIP (10 U / μ l)
- Proteinasa K (20 mg/ml)
- Solución de glicina (10X)
- PBS (20x)
Diluir a (1X) con agua libre de nucleasas
- DTT 1M liofilizado
Agregar al vial 50 μ l de agua ultrapura
- Buffer de unión a columna de ADN
Agregar al vial 120 μ l de la solución indicadora de pH y mezclar
- Buffer de lavado de columna de ADN
Agregar al vial 24 ml de etanol 95% y mezclar
- Buffer de lisis para ChIP 1
100 μ l de buffer de extracción de membrana + 1 μ l de Halt Cocktail, mantener en hielo
- Buffer de lisis para ChIP 2
50 μ l de buffer de extracción de nuclear + 0.5 μ l de Halt Cocktail, mantener en hielo
- Solución buffer de trabajo para digestión con MNasa
100 μ l de buffer de digestión con MNasa + 0.1 μ l de DTT 1M
- Buffer de dilución IP (1X)
100 μ l buffer de lavado/dilución IP (5X) + 5 μ l Halt Cocktail + 395 μ l H₂O libre de nucleasas
- Buffer de lavado IP1
0.1 ml de buffer de lavado/dilución IP (5X) + 0.4 ml H₂O libre de nucleasas
- Buffer de lavado IP2
0.2 ml buffer de lavado/dilución IP (5X) + 70 μ l Cloruro de sodio 5M + 0.73 ml H₂O libre de nucleasas
- Buffer de lavado IP3 (1X)
0.1 ml Buffer de lavado IP3 (5X) + 0.4 ml H₂O libre de nucleasas
- Buffer de elución IP (1X)
75 μ l buffer de elución IP (2X) completamente disuelto a 37°C + 75 μ l H₂O libre de nucleasas

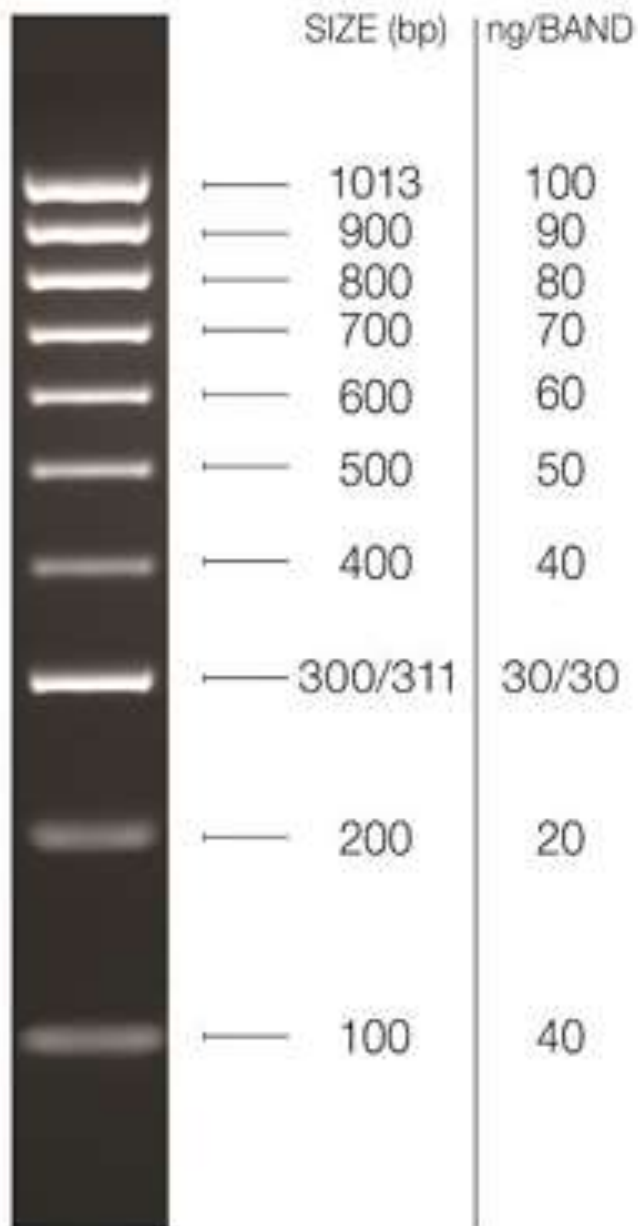
ANEXO II

MARCADORES DE PESO MOLECULAR PARA ADN

BIOLINE

(100 pares de bases)

HyperLadder™ 100bp



MARCADORES DE PESO MOLECULAR PARA PROTEINAS

New England Biolabs

250 KDa



Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10–250 kDa)

10–20% Tris-glycine SDS-PAGE Gel

ANEXO III

A/T: Adenina/Timina

AA: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEC: 3-amino-9-etil-carbazol

AGIF: Inmunodifusión en gel de agar

AM: Arabinomanano

ARN: Ácido ribonucleico

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

BMDM: Blood-monocyte-derived macrophages (Macrófagos derivados de medula ósea)

CF: Fijación de complemento

ChIP: Chromatin immunoprecipitation (Inmunoprecipitación de cromatina)

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

Colab: Colaboradores

Cp: Ceruloplasmina

Ctrl: Control

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC: Enfermedad de Crohn

ELISA: Enzyme-linked immunoSorbent assay (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima)

FAP: Fibronectin-attachment protein (Proteína fijadora de fibronectina)

FPN: Ferroportina

FUR/Fur: Ferric uptake regulator (Proteína reguladora de la captación de hierro)

GC: Guanina – Citosina

GNP: Gold nanoparticles (Nanopartículas de oro)

HEYM: Medio yema de huevo de Herrold

HPC: Hexadecilpiridinio

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

INF: Interferón

IRE: Iron-responsive element (Elementos de respuesta al hierro)

IRP: Iron regulatory protein (Proteína reguladora de hierro)

IS900: Insertion Sequence 900 (Secuencia de inserción 900)

JAK-STAT: Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription

Kb: Kilobases

KDa: Kilodaltons

LAM: Lipoarabinomananos

LFM: Lateral flow assay (Ensayo de flujo lateral)

LSP: Large sequence polymorphisms (Polimorfismos de secuencia larga)

LT: Linfocitos T

M: Molar

MAC: Mammary epithelial cells (Células epiteliales mamarias)

MAP: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

Mbt: Micobactina

mg: miligramos

ml: mililitros

mM: milimolar

MNasa: Micrococcal Nuclease (Nucleasa microcócica)

MPM: Marcador de peso molecular

MR: Receptor de manosa

MUR/Mur: Manganese uptake regulator (Regulador de la captación de manganeso)

ng: nanogramos

NK: Natural killer

nm: nanometros

nM: nanomolar

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a patogenos)

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate buffered saline (Buffer fosfato salino)

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PTB: Paratuberculosis bovina

PVDF: Polyvinylidene fluoride (Fluoruro de polivinilideno)

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa – Retrotranscriptasa)

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)

SFB: Fetal Bovine Serum (Suero fetal bovino)

Sln: Solución

TBS: Tris buffered saline (Buffer tris salino)

TNF: Tumor Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)

V: voltios

ZUR/Zur: Zinc uptake regulator (Regulador de la captación de zinc)

µg: Microgramos

µL: Microlitros