

Bertha Landeros Sánchez^{*1}

0000-0002-1293-2759

José A. Gutiérrez Pabello²

0000-0001-5801-5887

Gerardo E. Medina Basulto³

0000-0001-8338-8829

Tomás B. Rentería Evangelista⁴

0000-0002-1165-0055

Efrén Díaz Aparicio⁵

0000-0002-1669-1323

Sawako Oshima³

0000-0003-2302-8201

¹Laboratorio de Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja California
Calzada Universidad 14418, Parque Industrial
Internacional Tijuana
22390, Tijuana, Baja California, México²Departamento de Inmunología y Microbiología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, 04510
Ciudad de México, México³Laboratorio de Biología Molecular⁴Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias
Universidad Autónoma de Baja California
km. 3.5 Carretera San Felipe
Fraccionamiento Campestre
Mexicali, Baja California, 21386, México⁵Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Microbiología
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534
Col. Progreso, 62550, Jiutepec, Morelos, México***Autor para correspondencia:**

Tel: +52 664-265-4845

Correo electrónico:

bertha.landeros@uabc.edu.mx

El *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* disminuye la regulación de la expresión del ARNm de la ferroportina 1 en los macrófagos inducidos con hierro

Resumen

El *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente causal de la enfermedad de Johne. Los mecanismos por los cuales MAP es capaz de adaptarse a la respuesta natural del huésped aún no están claros. A través de la PCR en tiempo real, se examinaron los niveles de expresión del ARN de la ferroportina 1 (FPN1) en células de macrófagos de ratón J774 infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* o con el extracto crudo de proteína (ECP) de MAP. La multiplicidad de infección (MOI) con MAP dependió de la disminución de los niveles del ARNm de la FPN1. Los macrófagos infectados con las MOI de 20:1 y 15:1 no mostraron cambio alguno en la expresión del gen FPN1, mientras que en las MOI de 10:1 y 5:1, disminuyó en un 50% y 80%, respectivamente. En los macrófagos tratados con 50, 100, 150 y 200 µg/mL de ECP de MAP (ATCC19698), la expresión del ARNm de FPN1 disminuyó 25%. La sobreexpresión del ARNm de FPN1 en macrófagos J774 tratados con una sobrecarga de hierro de 400 µM de nitrilotriacetato férrico (FENTA) se suprimió cerca de un 70% por la infección con MAP viva (MOI 20:1). Estos datos revelaron que MAP inhibe la expresión del ARNm de FPN1, lo que sugiere que existe un mecanismo bacteriano que participa en la regulación del hierro del huésped.

Palabras clave: Expresión génica; Enfermedad de Johne; Ferroportina 1; Hierro; Macrófagos.

Introducción

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa caracterizada por causar diarrea y enterocolitis granulomatosa en rumiantes domésticos y silvestres. El *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente etiológico; este patógeno es capaz de infectar a los macrófagos entéricos y vivir de forma intracelular. Para multiplicarse dentro de las células del huésped, las bacterias requieren satisfacer sus demandas metabólicas específicas, entre ellas, de hierro —elemento clave que funciona como cofactor de muchas proteínas celulares que participan en el transporte de electrones, la desintoxicación de especies reductoras de oxígeno (ROS) y la síntesis de ADN (Eckelt *et al.*, 2014, 2015).

Recibido: 2015-10-12

Aceptado: 2016-03-16

Publicado: 2016-03-28

Información y declaraciones adicionales
en la página 10© Derechos de autor
Landeros Sánchez *et al.* 2016acceso abierto Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

El hierro no está disponible libremente, por lo tanto, las bacterias utilizan diferentes mecanismos de absorción para adquirirlo. Para ello, las bacterias producen sideróforos, hemóforos y receptores de superficie celular que capturan hemoproteínas (Krewulak y Vogel, 2008). En las micobacterias, la micobactina es una pseudobactina responsable de la unión y el transporte del hierro en las células. La micobactina es codificada por un grupo de genes denominados *mbtA-J* que inician su síntesis; en MAP el gen *mbtA* es más corto y codifica una versión incompleta de esta proteína. El truncamiento del gen *mbtA* puede explicar por qué MAP no es capaz de producir micobactina, por lo que es necesario agregarlo al medio de cultivo en el laboratorio (Li *et al.*, 2005).

A pesar de que *in vitro* se requiere micobactina, MAP sobreexpresa los genes implicados en la síntesis de micobactina en macrófagos bovinos (Zhu *et al.*, 2008). En presencia de hierro, el regulador transcripcional de MAP, el gen *IdeR*, reconoce secuencias consenso en regiones llamadas "cajas de hierro", localizadas en las regiones del promotor de genes encargadas de regular la expresión de genes implicados en la adquisición (*mbt*) y almacenamiento (*bfrA*) de hierro (Janagama *et al.*, 2009, 2010). Recientemente se caracterizó el interactoma de otro mecanismo de adquisición de hierro en MAP que depende del óxido nítrico (Lamont *et al.*, 2013).

La regulación de la homeostasis del hierro en los macrófagos involucra varias proteínas (Weiss, 2009). Los macrófagos pueden adquirir el hierro por medio del receptor de transferrina 1 (*tfr1*) y su captura está mediada por la transferrina. El hierro molecular puede obtenerse a través del transportador 1 (*Dmt1*) o por fagocitosis de los eritrocitos viejos. El hierro entonces se transporta, reutiliza y almacena en los macrófagos gracias a la interacción de elementos reguladores de hierro (IRES) con proteínas reguladoras del hierro (IRPS). La ferroportina 1 (*FPN1*) es una proteína de exportación de hierro que está presente en la superficie de los macrófagos, hepatocitos, enterocitos y eritrocitos y transporta la forma ferrosa del hierro (Fe^{2+}) (Abboud *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000). La salida de hierro de los macrófagos está controlada por la hepcidina, que interactúa con la *FPN1*. Esta interacción resulta en la internalización y degradación de la *FPN1* a través de los proteosomas, lo que bloquea el flujo de salida de hierro de los macrófagos (Nemeth *et al.*, 2004). La acumulación de hierro dentro del macrófago promueve el desarrollo de patógenos intracelulares y disminuye la secreción de IL-6 (Ganz, 2009). La expresión del ARNm de *FPN1* en los macrófagos aumenta con la infección de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y *Mycobacterium avium* (MA). Sin embargo, se obtuvo un incremento mayor en la expresión del ARNm del gen *fpn1* en MTB y de macrófagos infectados por MA cuando, de forma clásica, los macrófagos se activaron con interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) (Van Zandt *et al.*, 2008), aunque el efecto de MAP en la expresión del ARNm de *FPN1* aún no se comprende.

Tomando en cuenta las funciones y la importancia de la *FPN1* y del hierro durante la infección de MAP en los macrófagos, se hipotetizó que se necesita una alta concentración de hierro para la sobrevivencia de las micobacterias en los macrófagos durante el proceso de infección; por lo tanto, la expresión del ARNm de *FPN1* debería estar disminuida para facilitar el establecimiento de la infección.

En este estudio, se examinaron los niveles de expresión del ARNm de *FPN1* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en la línea celular de macrófagos de ratón J774. Para ello, se infectaron los macrófagos con MAP vivo, con o sin hierro y con el extracto de proteína cruda de MAP, lo que permi-

tió identificar la inhibición de la expresión del ARNm de *FPN1* como efecto directo de MAP en macrófagos tratados con hierro.

Materiales y métodos

Cultivos bacterianos y extracto de proteína cruda

El MAP (ATCC 19698) se cultivó en medio Middlebrook 7H 9 suplementado con ácido oleico, albúmina, catalasa (OADC) (Difco, Detroit, MI, USA), dextrosa y micobactina (Allied Monitor Inc., USA) (4 mg/L) durante cuatro semanas. Las bacterias se almacenaron a -70°C en alícuotas de 1 mL con 4×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL en medio RPMI 1640 (Difco, Detroit, MI, USA), con L-glutamina, aminoácidos, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio (RPMI completo [CRPMI]), con glicerol al 10%. La dilución y plateo de bacterias en medio Middlebrook 7H 11 con agar, suplementado con OADC y micobactina, confirmó el número de bacterias. Se prepararon extractos de proteína cruda de MAP a partir de un cultivo de 50 mL de un mes de crecimiento. La suspensión bacteriana se centrifugó por 20 min a 3,000 X g, las bacterias se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en CRPMI. La suspensión se mezcló con sílice en una proporción de 1 g/mL durante 5 min y se centrifugó 20 min a 3,000 X g para eliminar restos celulares; el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m. Se aplicó el método de Bradford para determinar la concentración de proteínas de MAP del extracto filtrado. Las alícuotas del extracto de proteínas crudas se mantuvieron a -70°C hasta que se les utilizó.

Cultivo celular de macrófagos de ratón J774

La línea celular de los macrófagos de ratón J774 se propagó en CRPMI enriquecido con 5% de suero fetal bovino inactivado con calor, sin antibióticos. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO_2 . Los macrófagos se diluyeron con azul tripano y se cuantificaron mediante el uso de una cámara de Neubauer. Se sembraron 1×10^6 células por pocillo en cada placa de seis pozos. Los macrófagos se cultivaron a 37°C con 5% de CO_2 durante cuatro horas para permitir la adherencia a la superficie. Las células no adherentes se retiraron lavando con CRPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino. Los macrófagos adherentes se utilizaron para los experimentos posteriores.

Tratamiento de macrófagos con MAP vivo y con extracto de proteína cruda

Para identificar el efecto en la expresión del ARNm de *FPN1* del tratamiento del extracto de proteína cruda de MAP y MAP vivo, se pusieron a cultivar las placas con monocapas de 1×10^6 macrófagos infectados con MAP vivo o tratados con el extracto de proteína cruda de MAP. Para la infección, se utilizaron cuatro diferentes multiplicidades de infección (mois 5:1, 10:1, 15:1 y 20:1); después las placas se centrifugaron a 200 X g durante 10 min y se incubaron a 37°C durante seis horas. Para el tratamiento con proteína, los pocillos se incubaron con 50, 100, 150 o 200 μ g/mL de proteína cruda de MAP durante 6 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo de todos los tratamientos; las células se

lavarón una vez con PBS 1X, y se les extrajo el ARN total. El resultado de la expresión de *FPN1* en los macrófagos fue el promedio de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones.

Tratamiento de macrófagos con ácido nitrilotriacetato férrico (FENTA)

Con el fin de identificar el efecto del tratamiento con hierro en la expresión del gen *fpn1* en los macrófagos, éstos se incubaron con diferentes concentraciones de ácido nitrilotriacético férrico (FENTA), un donador de hierro a la transferrina. Los macrófagos J774 de ratón (1×10^6 células) se indujeron con 100, 200 y 400 μM FENTA por 6, 9 o 12 horas en medio CRPMI suplementado con 5% de suero bovino fetal.

Para determinar el efecto de MAP en la infección de macrófagos con una sobrecarga de hierro, los macrófagos se infectaron con una MOI 20:1 o se les cultivó con 200 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de proteína cruda de MAP y 400 μM de FENTA (FENTA- MAP).

En todos los tratamientos, el medio se eliminó cuando finalizó la incubación, las células se lavaron una vez con PBS y el ARN total fue extraído y almacenado a -70°C . Los resultados de la expresión del gen *fpn1* de los macrófagos son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones.

Extracción del ARN total

El ARN total de los macrófagos se aisló con el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones e instrucciones del fabricante. Todas las muestras se trataron con ADNasa (ADNasa libre de ARNasa) y se purificaron usando el kit RNeasy MinElute™ Clean (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó midiendo la relación de la densidad óptica de 260/280 nm mediante el NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.)

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADNc se sintetizó de cuatro unidades (4 U) de enzima transcriptasa reversa Omniscript1 (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La enzima reaccionó en un volumen final de 20 μL , que contenía un buffer de transcriptasa reversa (1 X), dNTP, (0.5 mM cada uno), primers oligo-dT (1 μM), ARN total (1 μg) y agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 60 min a 37°C y la enzima se inactivó a 95°C durante 5 min. El volumen final se ajustó a 400 μL con agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *fpn1* de ratón fueron: (sentido 5' GCGTCATTGCTGCTAGAATCG 3', antisentido 5' CATGGAGTTCTGCACACCGTT 3') y como gen de control interno se usó el gen de *gapdh* (sentido 5' ACGGCA-CAGTCAAGGCAGAGAA 3', antisentido 5' TCTCGTCTCTGGAAGATGGTGA 3'). Estos oligonucleótidos se diseñaron utilizando el software Primer Express 2.0. La PCR en

tiempo real se realizó en el termo-analizador génico LightCycler 480 II (Roche, Suiza) y se utilizó el reactivo LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master (Roche, Indianapolis, IN, EE.UU.). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo a un volumen final de 20 µL, que contenía 10 µL del reactivo tampón 2X SYBR Green I master, los cebadores (S y A, 0.1 µL de cada uno), 5 µL de ADNC diluido y 4.8 µL de agua libre de nucleasas.

Todas las reacciones se colocaron en placas de 96 pocillos ópticos, que primero se incubaron a 95°C durante 10 min seguido de 45 ciclos a 95°C durante 10 s, a 60°C durante 15 s y a 72°C durante 15 s. Los valores de la fluorescencia se colectaron en cada ciclo. Al final de los 45 ciclos, se corrió una extensión final de 5 min a 72°C.

Se analizó la curva de fusión de cada mensajero para demostrar la especificidad y la eficiencia de la amplificación por la PCR se determinó mediante diluciones seriadas de muestras de ADNC. Se corrió un testigo negativo sin ADNC (CST, Control Sin Templado) en cada placa para evaluar la especificidad global; cada muestra se corrió por triplicado. Se determinó el umbral del ciclo (C_t , por sus siglas en inglés) para cada muestra a través de la fase de crecimiento exponencial y la señal de referencia de fluorescencia con respecto al número de ciclos. La muestra se consideró positiva si la fluorescencia superaba el umbral. Las curvas de fusión se transformaron a las primeras derivadas negativas de las curvas de fusión. En el análisis de las curvas de fusión, los primeros picos derivados negativos, característicos de la temperatura de fusión del producto de la PCR, identificaron los productos específicos de la PCR. Las reacciones de amplificación también se comprobaron de manera rutinaria para detectar la presencia de productos no específicos mediante electroforesis en gel de agarosa. Los valores del umbral del ciclo de la muestra se utilizaron para calcular las unidades de expresión relativa (UER) por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Qiagen. Integrative solutions solutions – real-time PCR applications, 2006). Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por análisis de varianza de una vía seguido por la prueba de Dunnett, usando el programa GraphPad Prism 6.0.7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). La significancia estadística se estableció a $P \leq 0.05$.

Resultados

La infección con MAP de los macrófagos de ratón indujo una expresión diferencial del ARNm de la *FPN1*, que dependió de la multiplicidad de infección

La infección con MAP vivo disminuyó los niveles del ARNm de la *FPN1* de manera dependiente de las MOIs utilizadas en este estudio. En comparación con el grupo testigo, los macrófagos infectados con MOIs de 20:1 y 15:1 no mostraron un cambio significativo en la expresión del gen *fpn1*, mientras que las MOIs de 10:1 y 5:1 indujeron una disminución de 50% y 80%, respectivamente ($P \leq 0.05$, figura 1).

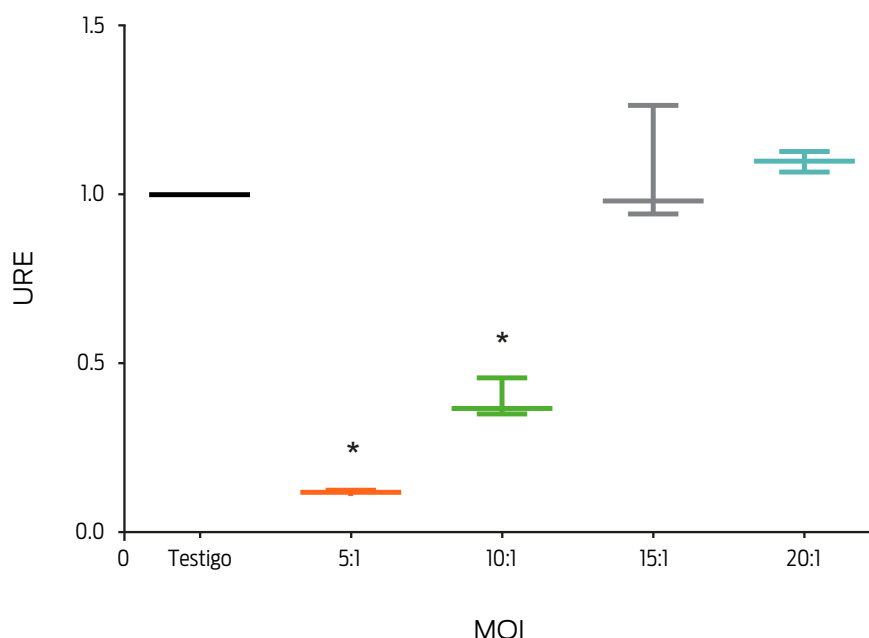


Figura 1. La infección con MAP inhibió la expresión del gen *fpn1* en los macrófagos. Los macrófagos de ratón J774 se infectaron con MAP a diferentes multiplicidades de infección (MOI) durante 6 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadph* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

La estimulación con diferentes concentraciones de extracto de proteína cruda de MAP disminuyó la expresión del ARNm de la FPN1 en macrófagos de ratón

Se analizó el efecto del extracto de la proteína cruda de MAP en la expresión del ARNm de la FPN1 de macrófagos de ratón J774. En este estudio, se decidió utilizar un rango de concentración de proteína que abarcara los límites de la variación experimental reportada en otras investigaciones (Ciaramella *et al.*, 2004; López *et al.*, 2003, 2015; Sánchez *et al.*, 2008). En los macrófagos tratados con 50, 100, 150 y 200 µg/mL de extracto crudo de proteína, la expresión del ARNm de la FPN1 disminuyó 25% ($P \leq 0.05$, figura 2).

El tratamiento con diferentes concentraciones de FeNTA indujo la expresión del ARNm de la FPN1 en macrófagos de ratón

La expresión del ARNm de la FPN1 se indujo con una sobrecarga de hierro en macrófagos de ratón J774 en presencia de 100, 200 y 400 µM de FeNTA a las 6, 9 y 12 horas. Los macrófagos tratados con FeNTA mostraron un aumento en la expresión del gen *fpn1* en todos los tiempos estudiados ($P \leq 0.05$, figura 3), que dependió de la concentración de FeNTA. Sin embargo, el tratamiento con 400 µM durante 6 horas indujo el mayor incremento (10 veces más). Por lo tanto, estas condiciones se utilizaron en experimentos posteriores.

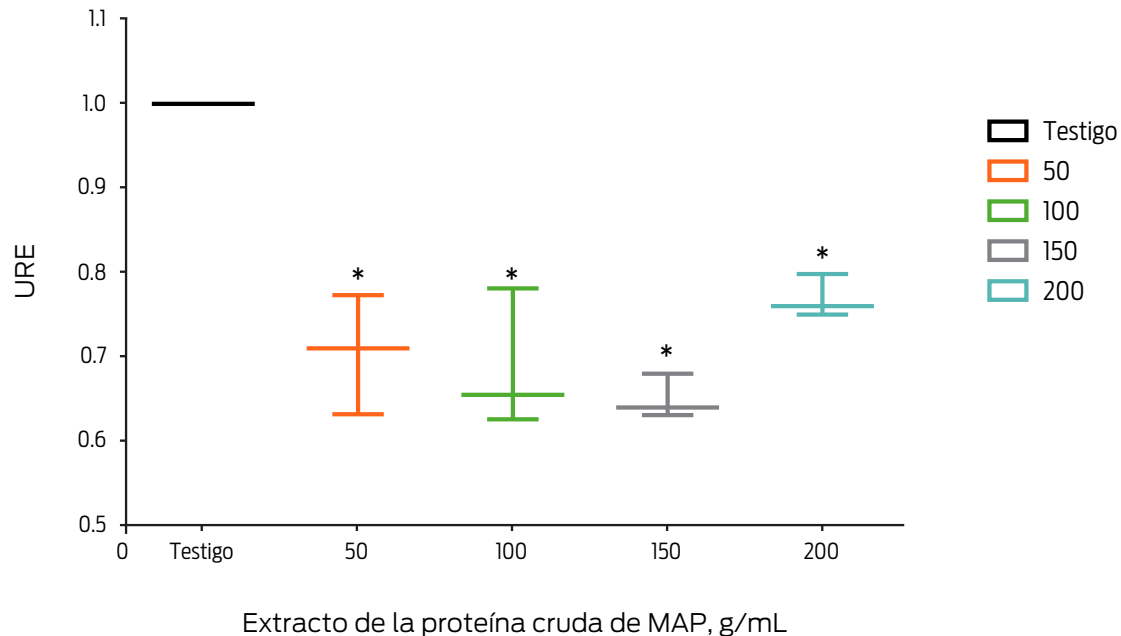


Figura 2. El tratamiento de los macrófagos con el extracto de la proteína cruda de MAP inhibió ligeramente la expresión del gen *fpn1*. Los macrófagos de ratón J774 se incubaron con diferentes concentraciones de extracto de la proteína cruda de MAP durante 6 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadph* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

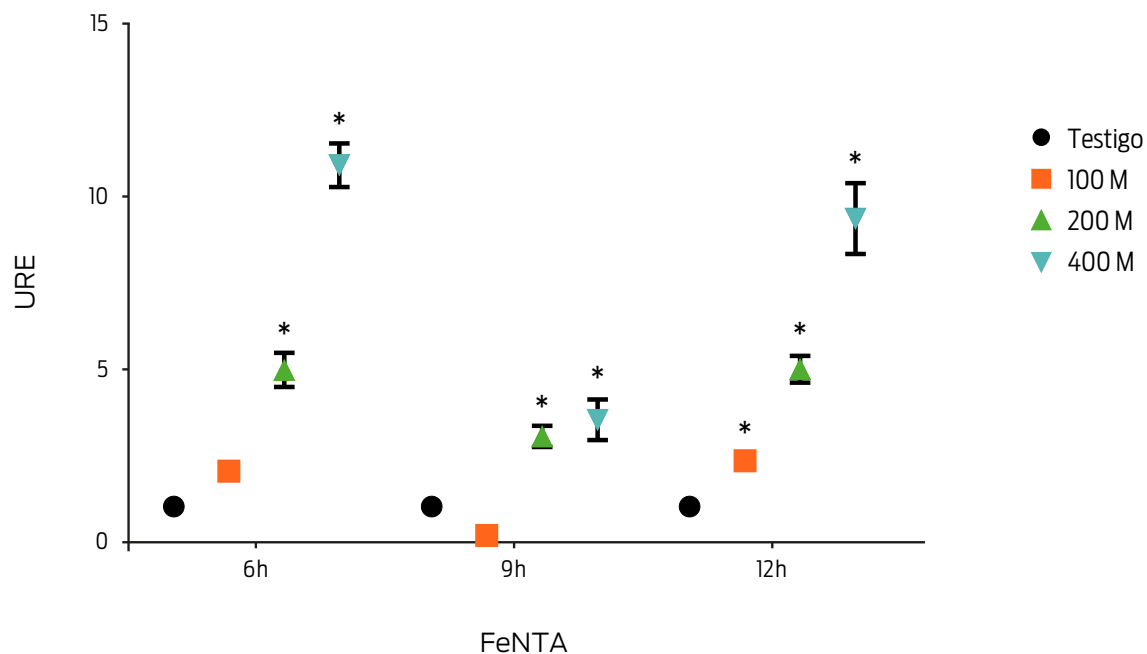


Figura 3. El tratamiento de los macrófagos con FeNTA aumentó la expresión del gen *fpn1* de una manera dependiente de la dosis. Los macrófagos de ratón J774 se incubaron con diferentes concentraciones de FeNTA durante 6, 9 y 12 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadph* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

La infección con MAP inhibió la expresión del ARNm de la *FPN1* en macrófagos de ratón inducidos con una sobrecarga de hierro (FeNTA)

Se midió el efecto de la expresión del ARNm de la *FPN1* en macrófagos infectados con MAP y con sobrecarga de hierro en el medio de cultivo. Los macrófagos incubados con 400 μ M de FENTA e infectados con MAP (FENTA-MAP) mostraron una inhibición de la expresión del ARNm de la *FPN1* de cerca de 70% comparada con la expresión génica en macrófagos no infectados, pero tratados con FeNTA ($P < 0.05$, figura 4).

Discusión

Los tratamientos con MAP vivo y con el extracto de proteína cruda de MAP inhibieron la expresión del ARNm de la *FPN1* en macrófagos de ratón J774. La inhibición fue mayor en el tratamiento con MAP vivo, lo que sugiere que la actividad metabólica de las bacterias juega un papel importante en este proceso. La expresión del ARNm de la *FPN1* dependió de las MOIs utilizadas. En la MOI de 10:1, la expresión del ARNm disminuyó 50%, mientras que en la de 5:1, la disminución fue de 80%. Las MOIs de 20:1 y 15:1 no modificaron la cantidad de ARNm respecto a los macrófagos sin tratamiento. Estos resultados son controvertidos; sin embargo, puede argumentarse que la cantidad de bacterias que infectan a una monocapa de ma-

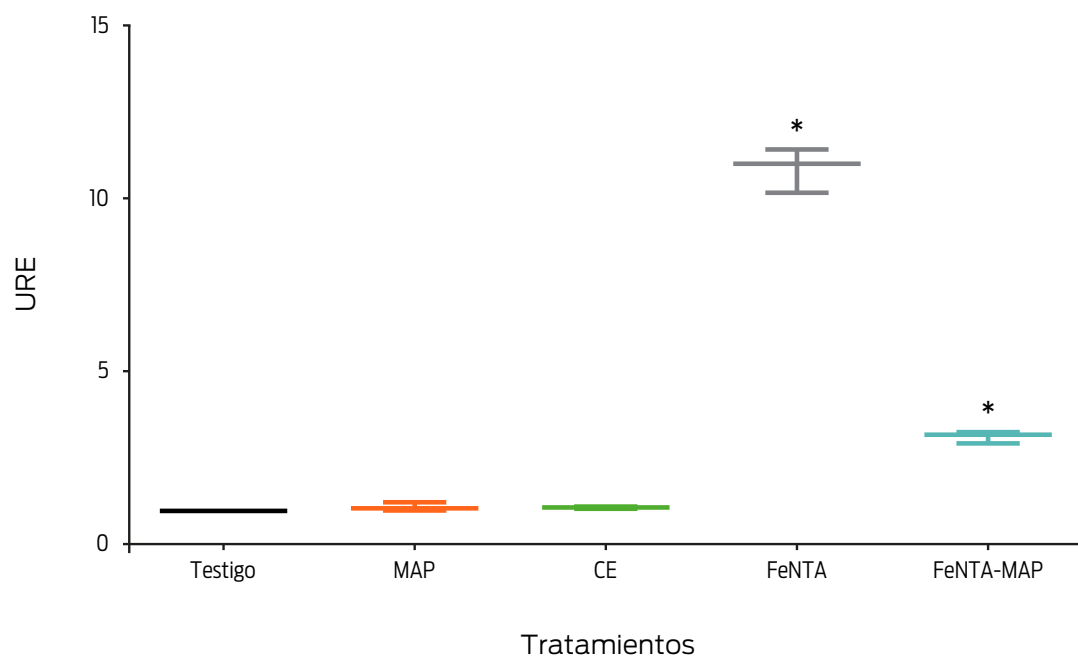


Figura 4. El tratamiento de los macrófagos con FeNTA-MAP disminuyó la expresión del gen *fpn1*. Los macrófagos de ratón J774 se trataron con una multiplicidad de infección (MOI) de 20:1 (MAP), con 200 mg/mL de extracto de proteína cruda de MAP (ECP), con 400mM de FeNTA o con 400 mM de FeNTA y una MOI de 20:1 (FeNTA-MAP) durante 6 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadh* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

crófagos puede generar resultados diferentes dependiendo de la multiplicidad de la infección.

La interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de MAP con los receptores de los macrófagos J774 puede estimular diferentes respuestas; sin embargo, bajo una elevada concentración de bacterias, la saturación del receptor de los macrófagos puede detener o cambiar la dirección de estas respuestas. Aún más, un aumento en la estimulación puede activar otras vías de señalización que interfieran con las respuestas que se generen bajo una concentración baja de bacterias. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* induce la apoptosis de los macrófagos con la participación de caspasas cuando se infectan con MOIs $\leq 10:1$, pero cuando los macrófagos se infectan con una MOI de 25:1, se apaga la activación de las caspasas (Lee *et al.* 2006). Por otro lado, los macrófagos infectados con una alta carga bacteriana pueden intentar redirigir la expresión génica para sobrevivir. Es razonable, entonces, proponer que un cambio en las condiciones celulares pueda modificar el escenario de la respuesta de la célula. Los presentes resultados señalan que los macrófagos infectados con una MOI de 20:1 fueron capaces de disminuir la expresión génica de *fpn1* cuando la célula se trató con una sobrecarga de hierro. Este hallazgo evidenció que el decremento en la expresión del ARNm de la FPN1 fue un efecto directo del tratamiento con MAP.

Existe evidencia de que la expresión de génica de *fpn1* se modifica por una infección bacteriana. Por ejemplo, la inhibición de la expresión del ARNm de la FPN1 en monocitos y macrófagos se ha relacionado con la exposición a patógenos Gram negativos y lipopolisacáridos (LPS), como parte de la respuesta inflamatoria aguda, donde también el $\text{IFN}\gamma$ y los receptores Toll-like participan de manera importante en la respuesta (Yang *et al.*, 2002; Ludwiczek *et al.*, 2003; Peyssonnaud *et al.*, 2006). Por el contrario, los macrófagos 264.7 y AMJ2-c8 activados con $\text{IFN}\gamma$ e infectados con MTB y MA sobreexpresaron el ARNm de la FPN1 (Van Zandt *et al.*, 2008). Sin embargo, en ausencia de $\text{IFN}\gamma$, MTB y *Mycobacterium bovis* BCG inhibieron la expresión génica de *fpn1* de una manera que dependió del tiempo (Li *et al.*, 2013). Estas observaciones en su conjunto sugieren la participación de las bacterias en la regulación de la expresión a nivel transcripcional de la FPN1, que también está regulada por la respuesta inmune, en un intento por favorecer la estancia de las bacterias. Es importante señalar que en los presentes experimentos no se abordó el efecto de MAP en presencia de mediadores inmunes como LPS o $\text{IFN}\gamma$. La influencia de estas moléculas en la expresión del ARNm de la FPN1 en macrófagos de ratón J774 infectados con MAP podría modificar estos hallazgos.

Los patógenos intracelulares compiten con la célula hospedera por el hierro intracelular (Weiss *et al.*, 1994). Desde la perspectiva de los patógenos, una disminución de la FPN1 es benéfica porque mantiene los niveles intracelulares de hierro necesarios para su supervivencia. Sin embargo, desde la perspectiva de la célula huésped, un aumento de la FPN1 contribuye a que el hierro se transporte hacia el exterior de la célula y de esta forma se evita la sobrevivencia de la bacteria (Janagama *et al.*, 2009).

Estos resultados demostraron que la infección con MAP disminuyó la expresión del gen *fpn1* bajo diferentes condiciones, un efecto ya documentado en otras investigaciones con otras especies de micobacterias. En términos de virulencia, ésta podría ser una estrategia para apoyar la supervivencia bacteriana.

Conclusiones

Se demostró que el *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) vivo o su extracto de proteína cruda disminuyeron los niveles del ARNm de la ferroportina 1 (FPN1). Estos hallazgos revelaron un efecto inhibitorio de MAP vivo en la expresión del ARNm de la FPN1 y sugieren que un mecanismo bacteriano de MAP puede cambiar las condiciones de regulación del hierro del huésped para soportar el microambiente hostil de los macrófagos.

Financiamiento

Esta investigación tuvo financiamiento de la Universidad Autónoma de Baja California, a través de la convocatoria interna para el Proyecto No. 201/5/C/20/14.

Conflictos de interés

José A. Gutiérrez Pabello es Secretario General de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los demás autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Bertha Landeros Sánchez diseñó la investigación, realizó los experimentos y escribió el manuscrito.

José A. Gutiérrez Pabello y Efrén Díaz Aparicio lideraron la investigación y el trabajo experimental, proporcionaron reactivos y materiales, analizaron los datos y revisaron y aprobaron el manuscrito para su publicación.

Gerardo E. Medina Basulto and Tomás B. Rentería Evangelista analizaron los datos y revisaron y aprobaron el manuscrito para su publicación.

Sawako Oshima diseñó la investigación, lideró la investigación y el trabajo experimental, proporcionó reactivos y materiales, analizó los datos y revisó y aprobó el manuscrito para su publicación.

Referencias

- 1) Abboud S, Haile DJ. 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal Biological Chemistry*, 275:19906-19912.
- 2) Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, Garg SK, Sanarico N, Bocchino M, Galati D, Martino A, Auricchio G, D'Orazio M, Stewart GR, Neyrolles O, Young DB, Colizzi V, Fraziano M. 2004. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 β by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *Journal of Infectious Diseases*, 190(6):1167-1176. doi:10.1086/423850
- 3) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 403:776-781.
- 4) Eckelt E, Jarek M, Frömke C, Meens J and Goethe R. 2014. Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *BMC Genomics*, 15:1076.

- 5) Eckelt E, Meißner T, Meens J, Laarmann K, Nerlich A, Jarek M, Weiss S, Gerlach G and Goethe R. 2015. FurA contributes to the oxidative stress response regulation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 6:16.
- 6) Ganz Tomas. 2009. Iron in innate immunity: Starve the invaders. *Current Opinion in Immunology*, 21:63-67.
- 7) Janagama H, Senthilkumar TM, Bannantine JP, Rodriguez GM, Smith I, Paustian ML, McGarvey JA, Sreevatsan S. 2009. Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbiology*, 155:3683-3690.
- 8) Janagama HK, Senthilkumar TM, Bannantine JP, Kugadas A, Jagtap P, Higgins LA, Witthuhn BA, Sreevatsan S. 2010. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiology*, 10:268-278.
- 9) Krewulak KD, Vogel HJ. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778:1781-1804.
- 10) Lamont E, Wayne Xu, and Srinand S. 2013. Host-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* interactome reveals a novel iron assimilation mechanism linked to nitric oxide stress during early infection. *BMC Genomics*, 14:694.
- 11) Lee J, Remold HG, leong MH, Kornfeld H. 2006. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *Journal of Immunology*. 176:4267-4274.
- 12) Li L, Bannantine J, Zhang Q, Amonsin A, May B, Alt D, Benerji N, Kanjilal S, Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:12344-12349.
- 13) Li W, Liu Y, Dong W, Tuo Q, Liu D, Wu F, Zhang L, Wu J, Zhang W. 2013. Impacts of *Mycobacterium tuberculosis* with different virulence on expressions of ferroportin and ferritin in infected macrophages. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 29(7):710-713.
- 14) López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. 2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *Journal of Immunology*, 170(5):2409-2416.
- 15) López-Rincón G, Mancilla R, Pereira-Suárez AL, Martínez-Neri PA, Ochoa-Zarzosa A, Muñoz-Valle JF, Estrada-Chávez C. 2015. Expression of autocrine prolactin and the short isoform of prolactin receptor are associated with inflammatory response and apoptosis in monocytes stimulated with *Mycobacterium bovis* proteins. *Experimental and Molecular Pathology*, 98:517-526.
- 16) Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. 2003. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, 101:4148-4154.
- 17) McKie A, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters T, Farzaneh F, Hediger M, Hentze M, Simpson R. 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*, 5:299-309.
- 18) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306:2090-2093.

- 19) Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson R, Nizet V. 2006. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, 107:3727-3732.
- 20) Qiagen. PCR Protocols & Applications [en línea]. <https://www.qiagen.com/mx/resources/molecular-biology-methods/pcr/#Real-time> [consulta: 03 mar 2015].
- 21) Sánchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69:20-28.
- 22) Van Zandt K, Sow F, Florence W, Zwilling B, Satoskar A, Schlesinger L, Lafuse W. 2008. 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*, 84:689-700.
- 23) Weiss G, Werner F, Werner E, Grunewald K, Wachter H, Hentze M. 1994. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *Journal of Experimental Medicine*, 180:969-976.
- 24) Weiss G. 2009. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790:682-693.
- 25) Yang F, Liu X, Quinones M, Melby P, Ghio A, Haile D. 2002. Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 277:39786-39791.
- 26) Zhu X, Tu ZJ, Coussens PM, Kapur V, Janagama H, Naser S, Sreevatsan S. 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes and Infection*, 10:1274-1282.