

La proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inhibe la expresión de MCP-1 de macrófagos J774A.1.

Raúl Eduardo Celis Zamora¹, Kaina Quintero Chávez¹, Francisco Guillermo Mendoza Hoffmann¹, Paola Moreno Lozano¹, Bertha Landeros Sánchez^{1*}.

¹Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería¹, UABC Otay Campus Tijuana: Calzada Universidad 14418 Parque Industrial Internacional Tijuana B.C., México. 22427.

Laboratorio de Biología e inmunología Molecular¹, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC Otay Campus Tijuana. Calzada Universidad 14418 Parque Industrial Internacional Tijuana B.C., México 22724.

Autor de correspondencia.*bertha.landeros@uabc.edu.mx, +52 664 265 4845.

Resumen

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es un agente etiológico reconocido de la enfermedad intestinal granulomatosa crónica en varias especies animales, causando la paratuberculosis. Está implicado en afecciones autoinmunes en humanos, tal es el caso de la enfermedad de Crohn. El gen MAP3773c codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas FUR, funciona como factor de transcripción, es capaz de modular la expresión de genes adyacentes y genes del huésped. Este estudio tuvo como objetivo analizar la expresión de la proteína MCP-1, en macrófagos de ratón J774 A.1 transfectados. El gen map3773c de MAP se clonó en el vector pCDNA3.1, se realizó la transfección de macrófagos utilizando Lipofectamina, se comprobó la expresión de MAP3773c con y sin hierro, por Western blotting. Se evaluaron los niveles de MCP-1 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos transfectados, mediante la técnica de ELISA. Hubo una expresión significativa de la proteína MAP3773c a las 24 horas después del tratamiento con hierro. La expresión de MCP-1, tuvo una reducción notable a las 24 y 48 horas. Nuestros resultados sugieren que la proteína MAP3773c puede ejercer un efecto inhibidor sobre las respuestas inflamatorias lo que conduce a una disminución de la actividad quimiotáctica y a una atenuación general de la respuesta inmunitaria. La proteína MAP3773c posiblemente forma parte de las proteínas importantes en la patología de la paratuberculosis.

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is an established etiological agent of chronic granulomatous bowel disease across various animal species, leading to paratuberculosis. Its relevance has extended to human autoimmune disorders, notably Crohn's disease. Within this framework, the MAP3773c gene encodes a protein classified

within the FUR family, functioning as a transcription factor that modulates the expression of adjacent and host genes. This study investigates the regulatory influence of MAP3773c on the expression of the MCP-1 protein in mouse macrophages. The map3773c gene was cloned into the pCDNA3.1 vector, followed by transfection of macrophages using Lipofectamine. Expression of MAP3773c was confirmed under iron without iron treatment conditions through Western blotting. Subsequently, MCP-1 levels were quantified in the supernatants of macrophages transfected with pcDNA-map3773c utilizing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Our results revealed a significant upregulation of MAP3773c protein expression 24 hours post-iron treatment. Conversely, MCP-1 expression exhibited a marked reduction at 24 and 48 hours post-transfection. These findings imply that the MAP3773c protein may be inhibitory in inflammatory responses, resulting in diminished chemotactic activity and an overall suppression of the immune response. Therefore, MAP3773c is likely integral to the pathophysiology of paratuberculosis.

Palabras clave: Respuesta inmune, MCP-1, proteína MAP3773c, paratuberculosis, pCDNA3.1.

Raúl Eduardo Celis Zamora, egresado de la licenciatura químico farmacobiólogo, Universidad Autónoma de Baja California, Campus Tijuana. raul.celis@uabc.edu.mx.

Kaina Quintero Chávez, estudiante de doctorado MyDCI, Universidad Autónoma de Baja California. kaina.quintero@uabc.edu.mx.

Francisco Guillermo Mendoza Hoffmann Dr. En Ciencias Químicas, Docente e investigador de tiempo completo, Universidad Autónoma de Baja California, Campus Tijuana. francisco.guillermo.mendoza.hoffmann@uabc.edu.mx.

Paola Moreno Lozano Maestra en Ciencias de la Salud, Docente de Asignatura, Universidad Autónoma de Baja California. paola.moreno6@uabc.edu.mx

Bertha Landeros Sánchez Dra. En Ciencias Agropecuarias, Docente e investigador de tiempo completo, Universidad Autónoma de Baja California, Campus Tijuana. bertha.landeros@uabc.edu.mx.

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP). Es una bacteria acidorresistente débilmente Grampositiva que causa la enfermedad de John o paratuberculosis en animales [1-3]. También está implicado en la causa de la enfermedad de Crohn (enfermedad inflamatoria intestinal) en humanos [4]. La paratuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más graves del ganado lechero en todo el mundo,

causando perdidas considerables en la producción en términos de reducción de la producción de leche, reducción en el aumento de peso, aumento en el sacrificio/muerte y un aumento del costo del control de la enfermedad [1,5]. Entre los atributos de una bacteria potencialmente patógena se encuentran su capacidad para acceder a un huésped susceptible, establecerse a través de la evasión de los mecanismos de defensa del huésped y multiplicarse en el huésped, lo que conduce a la enfermedad o daño tisular y eventualmente la diseminación a otros huéspedes [6]. Los factores genéticos que permiten al organismo alcanzar estos atributos patógenos se consideran factores de virulencia. Todavía queda mucho por entender sobre la patogenia de MAP y su virulencia en sus numerosos huéspedes. Existen informes de diferencias en la virulencia entre las diversas cepas que existen, así como diferencias en las susceptibilidades del huésped [7].

Se ha justificado que la primera respuesta de un organismo a los patógenos es una reacción inflamatoria, caracterizada por la migración de tipos celulares con funciones defensivas, alteraciones en la permeabilidad vascular y la secreción de medios solubles, como citocinas, quimiocinas e interferones [IFN]. Las células inflamatorias y los mediadores solubles tienen una potente actividad antimicrobiana y, juntos, representan la fase efectora de la resistencia innata. La activación de la respuesta inflamatoria/innata no es específica del patógeno, pero depende de la unión del ligando a los receptores codificados por la línea germinal (receptores de reconocimiento de patrones) que reconocen patrones moleculares que se conservan entre grandes clases de patógenos microbianos y son compartidos por ellas. [4].

La proteína MAP3773c de MAP está relacionada con la regulación de la homeostasis del hierro, la cual es crucial para la supervivencia de la bacteria en entornos donde el hierro es limitado, como dentro de los macrófagos. Esta proteína actúa como un regulador de la captación de hierro, similar a la familia de reguladores Fur (Ferric Uptake Regulator), que son esenciales para la adaptación y patogenicidad bacteriana. MAP3773c ha sido descrita como una proteína tipo Fur, con dos sitios de unión a metales, uno de ellos coordinando zinc estructural, lo que sugiere su papel en la regulación de genes involucrados en el estrés oxidativo y la adquisición de hierro. En condiciones de privación de hierro, esta proteína modula genes asociados con la biosíntesis de ácidos grasos y la formación de la pared celular, afectando la virulencia y la capacidad de la bacteria para sobrevivir en el huésped. Justificar su papel en la inhibición de la respuesta inflamatoria puede estar relacionado con su capacidad de alterar la síntesis de componentes celulares clave, como ácidos grasos y polisacáridos, que impactan la estructura de la pared celular y la respuesta inmune del huésped. La inhibición de estas rutas podría disminuir la activación de los mecanismos

inmunitarios del huésped, lo que permite a MAP evadir el sistema inmunológico y establecer infecciones crónicas. [1,2]

Hipótesis alternativa.

La expresión de la proteína MAP3773c en macrófagos, inhibe la expresión de MCP-1.

Hipótesis nula.

La expresión de la proteína MAP3773c, aumenta la expresión de MCP-1.

MATERIALES Y MÉTODOS.

i. Cultivo de *Escherichia coli* con el plásmido pcDNA 3.1-map3773c, a partir de una cepa en glicerol.

Se utilizó para purificar el plásmido pcDNA-map3773c una alícuota de un glicerol de la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3), clonado por la M.C. Dulce Liliana Dueñas Mena, en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Campus Tijuana, Universidad Autónoma de Baja California.

1. Se tomó un cultivo líquido de la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el plásmido pcDNA 3.1-map3773c para conservar y mantener plásmidos en 15 mL de caldo Luria Bertani estéril (NaCl 5.0 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L, hidrolizado enzimático de caseína 10.0 g/L, pH 7.5 ± 0.2) con una concentración final de 1 µL/mL (50 mg/mL) de ampicilina, durante toda la noche a 37 °C con una agitación constante de 200 rpm. 2. Se realizó una resiembra del cultivo, en cajas Petri con medio sólido Luria Bertani, durante toda la noche a 37 °C. 3. Se centrifugaron los cultivos líquidos a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La biomasa se congela a -20 °C, hasta su uso.

ii. Purificación del plásmido pcDNA 3.1-map3773c

1. Se descongelaron 1.7 gramos de biomasa celular en hielo molido y se resuspendió en 1 mL de GTE [50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl y 10 mM EDTA], durante 5 minutos a temperatura ambiente. 2. Se añadieron 2 mL de la solución NaOH/SDS [0.2 N NaOH y 1% SDS], se mezcló cuidadosamente por inversión y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. 3. Se añadieron 1.5 mL de la solución 5M Kac [5M Kac, Hac glacial y H₂O destilada] se mezcló en vortex durante 2 segundos o por inversión. 4. Se dejó en hielo molido durante 15 a 20 minutos. 5. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos (en tubos Corex) para separar eldebris celular y ADN cromosómico. 6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se recentrifugó.

Se le añadió 9 mL. (2 Volúmenes) de Etanol absoluto y se dejó 1 hora a -20°C. **7.** Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para precipitar ADN plasmídico y ARN total. Se eliminó el sobrenadante. **8.** Se lavó con 10 mL de etanol al 70%, se centrifugó en las mismas condiciones y se dejó secar el precipitado. **9.** Se le añadieron 300 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL Rnasa (100 µg/mL). Se Aseguró que el pellet formado se disolvió y posteriormente se transfirió a tubos de 1.5 mL.

10. Se incubaron los tubos a 37°C durante 30 minutos.

11. Posteriormente se le añadió un volumen igual de Fenol/Cloroformo/isoamílico (50/49/1). Posteriormente se agitó en vortex el tiempo necesario. **12.** Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. **13.** Se tomó la fase superior acuosa en un tubo nuevo. **14.** A los nuevos tubos Eppendorf se les añadió 30 µL (1/10 vol.) 5M Kac + 600 µL (2 volúmenes) de Etanol absoluto. **15.** Los tubos se dejaron 1 hora a -20°C. **16.** Enseguida se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. **17.** Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70%. Las muestras se dejaron secar a 37 °C durante 15 minutos. **18.** Finalmente el precipitado se disolvió en 100 µL de agua libre de nucleasas y se congelo a -20°C, hasta su uso. El plásmido fue cuantificado por espectrofotometría.

iii. Crecimiento y propagación de la línea celular continua J774A.1 de macrófagos de ratón.

1. Como primer paso fue descongelar un criovial de células congeladas de la línea celular continua J774A.1 re suspendidas en DMSO. [El vial contenía 1,000,000 de células resuspendidas en 1 mL de DMSO]. **2.** El criovial se pone en un baño maría a 37°C hasta observar que casi por completo se descongele. **3.** Se prepara un tubo cónico de 15 mL estéril y se le añaden 4.5 mL de medio DMEM/bajo en glucosa, + 4.00 mM L-Glutamina, + 1000 mg/L Glucosa, + 110 mg/L Piruvato de sodio (*Cytivia*). al medio de cultivo se le añadieron los antibióticos Gentamicina 20mg/mL (*HyClone*), Solución de penicilina – estreptomicina [10,000 unidades/mL penicilina/10,000 µg/mL estreptomicina] (*HyClone*), Suero fetal bovino al 10% (FBS, *HyClone*) ajustado a un pH de 7.3 ± 0.1 **4.** Se procesó el criovial descongelado inmediata y posteriormente se incorporó el contenido del vial en el tubo cónico de 15 mL con medio preparado/acondicionado previamente. **5.** Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. **6.** El sobrenadante se descartó y se adicionó nuevamente medio de cultivo preparado. **7.** Se mezcló suavemente hasta disolver el pellet formado. **8.** Se

repitió el proceso desde el paso número 5 con las mismas condiciones.

9. Se homogenizó el tubo cónico y se adicionó a cajas T25 y T75 acondicionadas y preparadas en las mismas condiciones como el en paso número 3. **10.** Ya en las cajas T25 y T75 se homogenizan las células con el medio acondicionado/preparado. **11.** Las cajas se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 2 a 3 horas, las células se observaron en un microscopio invertido (*LEICA_DMi1, Leica*) después de las 2 horas para determinar si el procedimiento anterior se realizó en buenas condiciones.

12. Despues de las 3 horas se decantó el medio y se lavaron 2 veces con PBS 1X; para la caja T75 se añadieron 10 mL de PBS 1X, para la caja T25 se añadieron 4 mL de PBS 1X para eliminar a restos celulares. **13.** Por ultimo se agregó el medio de cultivo preparado a las cajas T25 y T75, descritos en el paso anterior. **14.** Las cajas se incubaron a 37°C en condiciones atmosféricas de 5% de CO₂.

iv. Transfección de la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1 con el plásmido pcDNA3.1-map377c.

1. Una vez que las cajas T25 tuvieron una confluencia del 80% al 90%, se procede a utilizar raspadores de células para recolectar y contabilizar la cantidad de células vivas y muertas que existen en el medio de cultivo. **2.** Las células se contabilizaron en cámara de Neubauer con una solución de azul de tripano al 0.4%. Para contar a las células se añadieron 5 µL de muestra + 5 µL solución de azul tripano al 0.4% (1:1), se mezcló, se dejó reposar durante 2 minutos y se observó al microscopio para contabilizar. **3.** Las células vivas fueron usadas para realizar las transfecciones con el plásmido pcDNA3.1-map3773c. **4.** Para el diseño experimental establecido, como se muestra en la Tabla 1. Para el caso de las células transfectados con el plásmido pcDNA 3.1, con el plásmido pcDNA-map3773c y con pcDNA-map3773c+FeNTA, se transfectaron una cantidad de 4x10⁶ células en tubos cónicos de 15 mL con medio acondicionado/preparado en hielo molido. **5.** En otro tubo cónico de 15 mL se acondicionó y añadió 180 µg/µL de plásmido pcDNA3.1-map3773c y 1.8 mL de medio de cultivo preparado/acondicionado y por ultimo se agregó 108 µL del reactivo de transfección TurboFect, para generar el complejo de transfección. Se incubaron los complejos de transfección durante 10 minutos. **6.** Una vez generado el complejo de transfección, se añadió a las células con ligeros pipeteos, posteriormente se incubaron durante 15 minutos. **7.** Una vez generada la transfección de las células, estas se colocaron en nuevas cajas T25 acondicionadas con medio y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 y 48 horas. Las células de los tratamientos que llevaban neomicina, se le incorporó la

cantidad necesaria para la concentración de 400 μM . Para el caso de las células sin transfectar, colocamos 4×10^6 en botellas T25, acondicionadas con medio y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 y 48 hora. En la Tabla 1, se detalla cada uno de los tratamientos a las 24 y 48 horas.

v. Conservación y almacenamiento de macrófagos J774A.1 y sobrenadante posterior a la transfección.

1. Despues de las 24 y 48 horas, se recolectaron los sobrenadantes y macrófagos de cada tratamiento. Las muestras se guardaron y congelaron a -70°C .

vi. Cuantificación de los niveles de MCP-1 por la técnica de ELISA.

Se utilizó el Kit de Mouse MCP-1, Platinum ELISA de Invitrogen, para medir la citocina en los sobrenadantes de cultivo siguiendo las recomendaciones por el fabricante. Las placas se leyeron en un lector de microplacas (BIO-RAD, iMark), a 450 nm de absorbancia. Una cantidad menor que el valor de corte inferior para cada citocina se consideró como cero. Se realizó la curva estándar, para determinar las concentraciones de MCP-1.

vii. Análisis Estadístico.

Una vez obtenidos los análisis por duplicado de la expresión de MCP-1 los resultados fueron procesados utilizando en el Método estadístico de ANOVA o Análisis de varianza, para el análisis de los datos. En estos tratamientos se determinarán los cambios en la expresión de MCP-1, en los diferentes tratamientos, con relación a la expresión de la proteína MAP3773c.

RESULTADOS.

i. Concentración de plásmidos purificados pcDNA 3.1 y pcDNA- map3773c.

Muestra	Absorbancias (A260/A280) nm	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1. pCDNA 3.1 map3773c	2.438	121.9 $\mu\text{g/ml}$
2. pCDNA 3.1 map3773c	2.304	115.18 $\mu\text{g/ml}$
3 pCDNA 3.1	2.344	117.22 $\mu\text{g/ml}$

Tabla1. Concentraciones de plásmidos purificados.

ii. Confirmación del inserto del gen map3773c, clonado en pcDNA 3.1.

Se confirmo la presencia del gen *map3773c* mediante un PCR un corte con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* y una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio, obteniendo los fragmentos esperados de aproximadamente 420pb, como se muestra en la Figura 1, las concentraciones de los plásmidos se presentan en la Tabla 1.

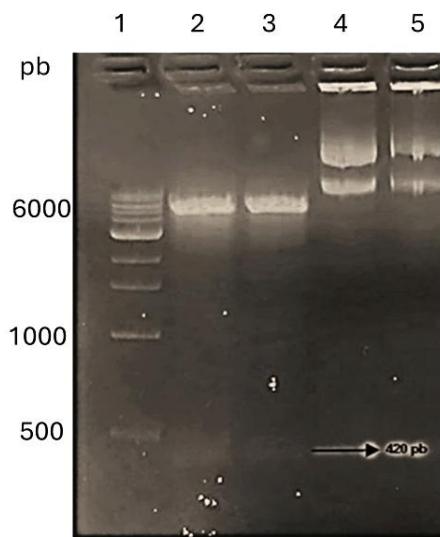


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación del inserto del gen *map3773c*, con el tamaño esperado de aproximadamente 420pb. Carriles de Izquierda a derecha. Carril 1, Marcador de peso molecular, carril 2 y 3 digestiones con *HindIII* y *EcoRI* pcDNA3.1-map3773c, carril 4 y 5 pcDNA 3.1 sin digerir.

iii. Expresión de MCP-1 en la línea celular J774A.1 en 24 y 48 horas.

Se cuantificaron los niveles de MCP-1 mediante la técnica de ELISA en sobrenadantes de cultivo de macrófagos tratados por diferentes tratamientos. Primero se realizó una curva estándar de 8 puntos para posteriormente determinar los valores de concentración de los diferentes tratamientos realizados se calcularon mediante Excel 2021, (Figura 2). Las placas se leyeron en un lector de absorbancia de microplacas (BIO-RAD, iMark). A 450 nm. Una cantidad menor que el valor de corte inferior para cada citocina se consideró como cero. Las concentraciones de MCP-1 se pueden observar en la Tabla 2, se presentan en pg/mL.

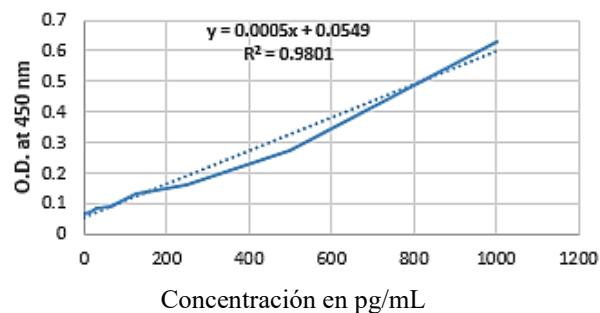


Figura 2. Curva estándar de Mouse MCP-1, Platinum ELISA. Datos tratados y obtenidos mediante Excel 2021.

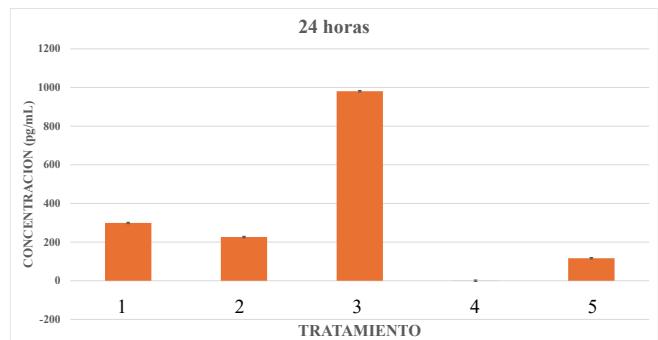


Figura 3.- Grafica de barras de Mouse MCP-1 Platinum ELISA 24 horas. Datos tratados y obtenidos mediante ANOVA, $p \leq 0,05$. En la barra 1 se presentan el tratamiento de los macrófagos sin transfectar y sin neomicina, 2, macrófagos transfectados con pcDNAmap3773c con neomicina, 3, macrófagos transfectados con pcDNA3.1, 4, macrófagos con neomicina, 5, macrófagos transfectados con pcDNAmap3773c con FeNTA y con neomicina.

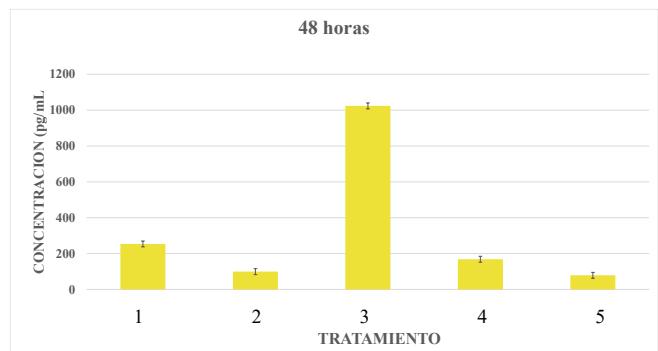


Figura 4.- Grafica de barras de Mouse MCP-1 Platinum ELISA 48 horas. Datos tratados y obtenidos mediante ANOVA, $p \leq 0,05$. En la barra 1 se presentan el tratamiento de los macrófagos sin transfectar y sin neomicina, 2, macrófagos transfectados con pcDNAmap3773c, con neomicina, 3, macrófagos transfectados con pcDNA3.1 con neomicina, 4, macrófagos con neomicina, 5, macrófagos transfectados con pcDNAmap3773c con FeNTA y con neomicina.

Tratamientos (24 y 48 horas)	Condiciones de los tratamientos	Concentración MCP-1 (pg/mL) 24 hrs	Concentración MCP-1 (pg/mL) 48 hrs
1	J774A.1 basal	298.803	253.889
2	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 map3773c + neomicina [400 mg/mL]	226.042	99.382
3	J774A.1 transfectadas sin pcDNA 3.1 + neomicina [400 mg/mL]	990.607	1023.725
4	J774A.1 no transfectadas + neomicina [400 mg/mL]	0.055	168.551
5	J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 map3773c + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 uM]	116.45	78.722

Tabla 2.- Concentración de MCP-1 en los sobrenadantes de 24 y 48 horas (pg/mL).

	Control sin tratamiento	pcDNA-map3773c+neo	pcDNA3.1+neo	Control+neo	pcDNA-map3773c+neo+FeNTA
Concentración 1	296.109	222.449	977.014	0.055	111.061
Concentración 2	301.498	229.635	984.2	0.055	121.84
Promedio	298.8035	226.042	980.607	0.055	116.4505
Desviación Están	3.811	5.081	5.081	0.000	7.622
Anova: Un factor					
Resumen					
Groups	Replicas	Suma	Promedio	Varianza	
Control (Sin Tra)	2	597.607	298.8035	14.5206605	
pcDNAmmap3773c	2	452.084	226.042	25.819298	
pcDNA3.1+Neo	2	1961.214	980.607	25.819298	
Sin transfectar +	2	0.11	0.055	0	
pcDNAmmap3773c	2	232.901	116.4505	58.0934205	
ANOVA					
Urgen de Variacio:	SS	df	MS	F	P-valor
Entre grupos	1178759.554	4	294.689.8885	11858.49253	3.99137E-10
con los grupos	124.252677	5	24.8505354		5.192167773
Total	1178883.807	9			

Tabla 3.- Resultados de ANOVA.

Comparación de las concentraciones de MACP-1 los tratamientos y resultados obtenidos. Línea 1, Figuras 3 y 4.

1. MCP-1 en macrófagos J774A.1 no transfectados:

24 horas: 298.803 pg/mL

48 horas: 253.889 pg/mL

Este tratamiento es el blanco del experimento. En los macrófagos sin tratamiento se observa una disminución en la concentración de MCP-1 a las 48 horas. Esto puede indicar que la respuesta inflamatoria en las células no transfectadas disminuye con el tiempo, ya que la producción de MCP-1

generalmente se regula a la baja en ausencia de estímulos adicionales.

**2. Macrófagos J774A.1 transfectados con pcDNA *map3773c* + neomicina [400 mg/mL]:
Línea 2, Figuras 3 y 4.**

24 horas: 226.042 pg/mL

48 horas: 99.382 pg/mL

La concentración de MCP-1 en estas células también disminuye de 24 a 48 horas. Esto puede reflejar que, aunque la transfección con *map3773c* reduce la producción de MCP-1 en comparación con las células no transfectadas en la línea 1, su efecto inhibitorio se vuelve más evidente con el tiempo, sugiriendo que MAP3773c podría estar modulando la respuesta inflamatoria de manera sostenida.

**3. Macrófagos J774A.1 transfectados con pcDNA 3.1 sin gen *map3773c* + neomicina [400 mg/mL]:
Línea 3, Figuras 3 y 4.**

24 horas: 990.607 pg/mL

48 horas: 1023.725 pg/mL

Aquí vemos un aumento de MCP-1 entre las 24 y 48 horas. Este aumento podría indicar que las células no transfectadas, pero con neomicina tienen una respuesta inflamatoria más robusta, posiblemente por la activación de mecanismos celulares debido al plásmido pcDNA 3.1. La transfección de células parece inducir una mayor liberación de MCP-1, tal vez como respuesta a la transfección misma o a la activación de vías de estrés.

**4. Macrófagos J774A.1 no transfectados + neomicina [400 mg/mL]
Línea 4, Figuras 3 y 4.**

24 horas: 0.055 pg/mL

48 horas: 168.551 pg/mL

Este aumento en la producción de MCP-1 a las 48 horas es significativo. Puede sugerir que la neomicina, a medida que se acumula o interactúa con las células, genera una mayor liberación de MCP-1 con el tiempo. Este efecto es notablemente bajo a las 24 horas, pero se incrementa significativamente después de 48 horas, lo que podría indicar un efecto temporal de la neomicina que se manifiesta más claramente después de un período de incubación más largo.

5. Macrófagos J774A.1 transfectadas con pcDNA 3.1 *map3773c* + neomicina [400 mg/mL] + FeNTA [400 µM]

Línea 5, Figuras 3 y 4.

24 horas: 116.45 pg/mL

48 horas: 78.722 pg/mL

En este tratamiento, la expresión de MCP-1, disminuyó con respecto a los macrófagos sin transfectar que son los de la línea 1 y a las 48 horas disminuye aún más la expresión de MCP-1, lo que posiblemente indica que la proteína MAP3773c, inhibe la expresión a nivel traduccional de MCP-1, posiblemente por el tratamiento con hierro.

DISCUSIÓN.

En el análisis por ANOVA, la expresión de la proteína MAP3773c en los diferentes tratamientos mostró un valor de p (3.99E-10), entre los grupos, (Tabla 3) extremadamente significativo, muy por debajo del umbral de 0.05. Esto indica diferencias altamente significativas entre todos los tratamientos. La proteína MAP3773c parece tener un efecto modulador sobre la producción de MCP-1 en macrófagos J774A.1. En las células transfectadas con el gen *map3773c* se observa una reducción en los niveles de MCP-1 tanto a las 24 horas como a las 48 horas, con hierro y sin hierro (Líneas 2 y 4 de las Figuras 3 y 4) lo que sugiere que la proteína MAP3773c tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta inflamatoria. Por otro lado, las células transfectadas (solo con pcDNA 3.1) mostraron un aumento de MCP-1 dependiente del tiempo, lo que podría estar relacionado con una respuesta inflamatoria. La neomicina parece jugar un papel importante, ya que los macrófagos no transfectados con neomicina, mostraron un aumento progresivo de MCP-1 con respecto al tiempo. La neomicina es un antibiótico aminoglucósido que puede generar estrés celular o activar vías inflamatorias, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición, en algunos modelos celulares. El estrés celular puede activar vías de señalización como NF-κB o MAPK, que están implicadas en la expresión de citocinas como MCP-1. Sin embargo, estos efectos no son específicos ni deseados, y suelen ocurrir a concentraciones altas o bajo condiciones de exposición prolongada. Con respecto al tratamiento con pcDNA *map3773c* y FeNTA parecen tener un efecto inhibitorio adicional a las 48 horas, como se observa en la disminución de MCP-1, lo que refuerza la idea que MAP3773c regula negativamente la respuesta inflamatoria. Observamos una reducción significativa en la expresión de MCP-1 después de la transfección con el plásmido pcDNA

3.1 utilizando Lipofectamina. Este resultado sugiere que MAP3773c podría actuar como un regulador negativo de la expresión de MCP-1 en estas células y que podría actuar de forma similar para el caso de Ferroportina 1 de ratón, en nuestras investigaciones [9,10]. Además, la baja expresión de MCP-1 podría estar mediada por la interferencia con los mecanismos de transcripción o señalización necesarios para su expresión, así como por la activación de respuestas de estrés celular inducidas por la MAP3773c. La Lipofectamina, como agente de transfección lipídico, puede causar estrés celular debido a varios mecanismos moleculares asociados a su interacción con las células y a los procesos involucrados en la internalización del material genético [10].

Los resultados sugieren que MAP3773c podría tener un efecto inhibidor sobre la producción de MCP-1, un importante mediador inflamatorio en los macrófagos. Esto sugiere que MAP3773c podría jugar un papel en la modulación de la respuesta inflamatoria, lo que podría ser relevante en enfermedades donde la inflamación crónica juega un papel central, como en enfermedades autoinmunes o inflamatorias [11].

Dado el comportamiento observado en los niveles de MCP-1, una perspectiva futura sería investigar las vías de transducción a través de las cuales MAP3773c ejerce su efecto sobre la inflamación. Esto podría incluir el estudio de vías de señalización como NF-κB, MAPK, o JAK/STAT, que son conocidas por regular la expresión de citocinas inflamatorias, como TNF, IL-6 e IL-1 β , entre otras [11, 12, 13], que en un futuro también determinaremos.

CONCLUSIÓN.

La proteína MAP3773c parece reducir la expresión de MCP-1 a nivel traduccional en macrófagos J774A.1 dependiente del tiempo (24 y 48 horas), lo que podría ser un indicador de su papel en la modulación de la inflamación. El tratamiento con FeNTA reforzó la disminución de MCP-1, cuando se transfirieron las células con pcDNA-map3773c, lo que indica un efecto antiinflamatorio o supresor adicional. Estos resultados son importantes para entender cómo MAP3773c modula la inflamación en macrófagos, lo cual podría tener aplicaciones terapéuticas en enfermedades inflamatorias. Aunque falta la investigación de la expresión de otras citocinas inflamatorias a nivel transcripcional y traduccional, podemos establecer el efecto de MAP3773c en macrófagos de ratón J774.

BIBLIOGRAFÍA.

- [1]. Sekitoleko, J.; Ojok, L.; Abd El Wahed, A.; Erume, J.; Amanzada, A.; Eltayeb, E.; Eltom, K.H.; Okuni, J.B. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Virulence: A Review*. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2623. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122623>.
- [2]. Cousins, D.; Condron, R.; Eamens, G.; Whittington, R.; De Lisle, G. *Paratuberculosis (Johne's disease)*. *Aust. N. Z. Stand. Diagn. Proced.* **2002**, *1*, 1–21.
- [3]. Olsen, I.; Sigurgardottir, G.; Djonne, B. *Paratuberculosis with special reference to cattle. A review*. *Vet. Q.* **2002**, *24*, 12–28.
- [4]. Hermon-Taylor, J.; Bull, T.J.; Sheridan, J.M.; Cheng, J.; Stellakis, M.L.; Sumar, N. *Causation of Crohn's Disease by Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis*. *Can. J. Gastroenterol.* **2000**, *14*, 798305.
- [5]. Correa-Valencia, N.; García-Tamayo, Y.M.; Fernández-Silva, J.A. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Colombia (1924-2016): A review*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **2018**, *31*, 165–179.
- [6]. Webb, S.A.; Kahler, C.M. *Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences*. *Crit. Care* **2008**, *12*, 234.
- [7]. Verna, A.E.; Garcia-Pariente, C.; Muñoz, M.; Moreno, O.; García-Marin, J.F.; Romano, M.I.; Paolicchi, F.; Perez, V. *Variation in the Immunopathological Responses of Lambs after Experimental Infection with Different Strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health* **2007**, *54*, 243–252.
- [8]. Dueñas Mena, D. L., Gutiérrez-Pabello, J. A., Quintero Chávez, K., Brito-Perea, M. D. C., Díaz Padilla, D. M., Cortez Hernández, O., Chávez Méndez, J. R., Alcalá Zacarias, J. M., Vela Sancho, G. B., & Landeros Sánchez, B. (2024). Binding of MAP3773c Protein of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in the Mouse Ferroportin1 Coding Region. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(23), 12687.
- [9]. Hernández-Guevara, E., Gutiérrez-Pabello, J. A., Quintero-Chávez, K., Brito-Perea, M. D. C., Hurtado-Ayala, L. A., Ibarra-Molina, G., Cortez-Hernández, O., Dueñas-Mena, D. L., Fernández-Otal, Á., Fillat, M. F., & Landeros-Sánchez, B.

- (2022). In Silico and In Vitro Analysis of MAP3773c Protein from *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Biology*, 11(8), 1183.
- [10]. Thapa, S., Rathnaiah, G., Zinniel, D.K. 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).
- [11]. Sanjiv Singh, D. Anshita, V. Ravichandiran, MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease, International Immunopharmacology, Volume 101, Part B, 2021, 107598, ISSN 1567-5769.
- [12]. Schröder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : An overview of signals, mechanisms, and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
- [13]. Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>