



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESPUESTA INMUNE DE
OVINOS INFECTADOS NATURALMENTE CON *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* VACUNADOS CON LA PROTEÍNA P35
EXPRESADA EN EL FAGO M13 RECOMBINANTE”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
DIANA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

TUTOR:
DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS - FMVZ

COMITÉ TUTORAL:
DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN - IIB
DR. JORGE RAMÍREZ SALCEDO – IFC

MÉXICO, D.F. ENERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos

Eduardo Galeano

La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa!
Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay
que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que
alcanzarla, cueste lo que cueste.

Marie Curie

Para vivir hay que elegir sin miedo

Sandra Mihanovich

DEDICATORIAS:

A mi pequeño hijo, por ser una luz en mi vida desde que supe de su llegada. Por representar esa valentía hacia lo desconocido, por darme tantas enseñanzas en tan poco tiempo y por traerme mucha alegría a mi vida. Te amo!!!

A mi mamá, por todo tu apoyo y amor incondicional. Sin tu ayuda este trabajo no hubiera podido culminar, gracias por todo.

A mi hermanito por ser mi cómplice y mi confidente, gracias por ser parte de esta aventura.

A mi padre, en tu memoria va un nuevo logro más. Gracias por no dejarnos, sé que estás con nosotros en todo momento cuidando nuestros pasos.

A mi familia, por todo su apoyo para que yo pudiera culminar este trabajo.

A mi familia por elección, aquellos que han estado, están y estarán siempre en mi vida. Los amo!!!

A todas las personas que fueron parte de este proceso, gracias infinitas por su apoyo incondicional que me permitió culminar esta etapa. Soy la persona más afortunada del planeta por haberme encontrado a personitas tan valiosas como ustedes que me tendieron la mano de forma incondicional. Estaré eternamente agradecida con todos y cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTOS:

A la vida, por darme tanto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*. Gracias por haberme permitido crecer, aprender, disfrutar y saborear del conocimiento y de la vida.

Al Dr. Gilberto Chávez Gris, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con usted y además haberme brindado su amistad. Es un ejemplo para mí, un excelente jefe y de las personas más elocuentes que conozco. Gracias por todo su apoyo y por ser tan comprensivo conmigo. Me quedo con un buen sabor de boca.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, gracias por el conocimiento transmitido, por sus críticas al trabajo y por el apoyo brindado.

A mi comité tutor, el Dr. Karen Manoutcharian y Jorge Ramírez gracias por sus valiosos comentarios y apoyo de instalaciones para que este trabajo pudiera realizarse.

A M. I.B.B. Simón Guzmán León, muchas gracias por tu asesoría, apoyo y consejos en la realización de los microarreglos.

A la M. en B. María Elena Mungúia Zamudio y al Ing. Abel Blancas, por todo su apoyo para poder llevar a cabo la producción del antígeno. Gracias por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Antonio Verdugo y todos los chic@s de su laboratorio, gracias por su apoyo y valiosos comentarios que hicieron varias aportaciones para este trabajo.

A las personas que laboran en el CEIEPAA y la USEDICO que me apoyaron en todo momento para que pudiera terminar mi trabajo. Gracias por su amistad, consejos y apoyo incondicional.

A los proyectos **PAPIIT IT225211**. "Desarrollo de sistemas para el diagnóstico en suero y leche en rumiantes afectados por paratuberculosis " y **PAPIIT IT202914**. "Desarrollo de estrategias de diagnóstico y control de la paratuberculosis en México", cuyo responsable es el Dr. Gilberto Chávez Gris. Por el financiamiento brindado que hizo posible llevar a cabo este trabajo.

Resumen

González Rodríguez Diana. “**Caracterización molecular de la respuesta inmune de ovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vacunados con la proteína P35 expresada en el fago M13 recombinante**”. Tutor principal: Dr. Gilberto Chávez Gris. Comité tutor: Dr. Karen Manoutcharian Airapetian y Dr. Jorge Ramírez Salcedo.

La paratuberculosis es causada por bacilos ácido alcohol resistentes de la especie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Actualmente, existen diferentes métodos de control de la paratuberculosis, entre ellos, la vacunación. Las vacunas disponibles en el mercado ayudan a prevenir la enfermedad clínica y a mermar los signos, pero no evitan la infección; además, interfieren con el diagnóstico y control de la tuberculosis bovina. Actualmente, en México no existe una vacuna disponible. *M. paratuberculosis* posee una proteína de membrana de 35 kDa (P35), antígeno inmunodominante que estimula la respuesta inmune celular, la cual está reportada en *M. avium* y *M. leprae*, pero no está presente en *M. tuberculosis* ni en *M. bovis*. El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización molecular de la respuesta inmune a partir de leucocitos, a través de microarreglos heterólogos, a las 2 y 5 semanas postvacunación de tres ovinos infectados naturalmente con *M. paratuberculosis* vacunados con el fago P35 recombinante para identificar el tipo de respuesta que genera esta vacuna en los ovinos. Se observó expresión diferencial de genes y modificación de diversas vías metabólicas, se sesgó a los relacionados con la respuesta inmune. A las 2 y 5 semanas postvacunación, se encontró modificación en la expresión de genes relacionados con la respuesta Th1, con las vías de señalización celular, el tránsito intracelular, adhesión y la respuesta Th2. Particularmente, existe un aumento que se mantiene en la segunda y quinta semana postvacunación en la expresión de los genes *Ifng*, *Il1b*, relacionados con la respuesta inmune celular, capaz de controlar a la infección; de *Ikbkg*, *Lcp2*, *Fcer1g*, *Zap70*, *Traf6*, relacionados con las vías de señalización celular que activan factores de transcripción asociados a la expresión de citocinas que eventualmente contribuyen al control de la infección, e *Il4*, que sugiere una expresión simultánea de genes asociados a respuesta Th1 y Th2. Los resultados difieren de los obtenidos en infecciones experimentales. **Palabras clave: Paratuberculosis, P35, vacunación, microarreglos.**

Abstract

Diana Gonzalez Rodriguez. "**Molecular characterization of the immune response to sheep naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccinated with the P35 protein expressed in recombinant M13 phage**"

Paratuberculosis is caused by acid alcohol resistant bacilli *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Currently, there are different methods of control of paratuberculosis, including vaccination. The commercially available vaccines help prevent clinical disease and diminish the signs, but do not prevent infection; also interfere with the diagnosis and control of bovine tuberculosis. Currently, in Mexico there is no vaccine available. *M. paratuberculosis* has a membrane protein of 35 kDa (P35), immunodominant antigen that stimulates cellular immune response, which is reported in *M. avium* and *M. leprae*, but it is not present in *M. tuberculosis* or *M. bovis*. The aim of this study was to perform molecular characterization of the immune response through heterologous microarray, at 2 and 5 weeks post-vaccination from leucocytes of three sheep naturally infected with *M. paratuberculosis* vaccinated with the recombinant phage P35 to identify the type of response generated by the vaccine. Differential gene expression and modification of various metabolic pathways was observed, but it is skewed to related to the immune response. At 2 and 5 weeks post-vaccination, changes in the gene expression were found in the Th1 response, cell signaling pathways, intracellular traffic, adhesion and Th2 response. Particularly, there is an increase that is maintained in the second and fifth weeks post-vaccination in expression *Ifng*, *Il1B*, related to the cellular immune response capable of controlling infection genes; of *IKBKG*, *LCP2*, *Fcer1g*, *Zap70*, *TRAF6*, related cellular signaling pathways that activate transcription factors associated with the expression of cytokines which eventually help control the infection, and *IL4*, which suggests a simultaneous expression of genes associated with Th1 and Th2. The results differ from those obtained in experimental infections.

Keywords: Paratuberculosis, P35, vaccination, microarrays.

CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
1.0 Introducción.....	1
2.0 Agente etiológico.....	2
3.0 Estructura genómica y proteómica de <i>M. paratuberculosis</i>	3
4.0 Proteína P35 de <i>M. paratuberculosis</i>	4
5.0 Regulación de los genes que codifican factores de virulencia de <i>M. paratuberculosis</i>	5
6.0 Estrategias de <i>M. paratuberculosis</i> para la sobrevivencia extra e intracelular	7
7.0 <i>M. paratuberculosis</i> y la respuesta inmune en rumiantes.....	12
8.0 Uso de microarreglos en la evaluación de la respuesta inmune en rumiantes infectados con <i>M. paratuberculosis</i>	17
9.0 Diagnóstico... ..	18
10.0 Estrategias de control.....	20
11.0 Vacunación como método de control contra <i>M. paratuberculosis</i>	22
11.1 Eficacia de la vacunación en el control de la paratuberculosis en diversos países.....	25
11.2 Desarrollo de nuevas vacunas contra la paratuberculosis.....	28
12.0 Justificación.....	30
13.0 Hipótesis.....	31
14.0 Objetivo.....	31
15.0 Materiales y Métodos.....	32
16.0 Resultados.....	49
17.0 Discusión.....	71
18.0 Conclusiones.....	80
19.0 Prospectiva.....	81
20.0 Anexo A.....	82
21.0 Literatura Citada.....	97

PÁGINA

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.....	4
Cuadro 2.....	43
Cuadro 3.....	43
Cuadro 4.....	45
Cuadro 5.....	46
Cuadro 6.....	47
Cuadro 7.....	50
Cuadro 8.....	52
Cuadro 9.....	59
Cuadro 10.....	60
Cuadro 11.....	61
Cuadro 12.....	62

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	3
Figura 2	13
Figura 3.....	15
Figura 4.....	16
Figura 5.....	23
Figura 6.....	32
Figura 7.....	33
Figura 8.....	34
Figura 9.....	49
Figura 10.....	51
Figura 11.....	51
Figura 12.....	51

Figura 13.....	54
Figura 14.....	55
Figura 15.....	56
Figura 16.....	56
Figura 17.....	58
Figura 18.....	68
Figura 19.....	70

ABREVIATURAS

aaADNc	ADNc Aminoallyl
AD	Genes asociados a la adherencia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Amp	Ampicilina
BAD	BCL2 Antagonista de la Muerte Celular
C.b.p.	Cuanto baste para
Cb	Carbenicilina
CC	Condición corporal
CEEIPAA	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animale en Alt...
CR1	Receptor 1 del Complemento
CR3	Receptor 3 del Complemento
CR4	Receptor 4 del Complemento
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEA1	Antígeno de los Endosomas Tempranos 1
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FAP-P	<i>Fibronectin Attachment Proteins</i>
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g	Gravedades
h	Horas
HCP	N-cetil-pirinium
IDGA	Doble Inmunodifusión en Gel de Agarosa
IFC	Instituto de Fisiología Celular
IFNγ	Interferón Gamma
kDa	Kilodaltones

KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kna	Kanamicina
L	Litro
LB	Luria Bertani
<i>Maa</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
mg	Miligramo
MHC I	Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase I
MHC II	Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase II
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de Infección
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
nm	Nanómetros
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
p.v.	Postvacunación
pb	Pares de bases
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRq	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
PEG	Polietilenglicol
pmol	Picomolas
PPD	Derivado Proteico Purificado
PS	Genes asociados al proteosoma
QC	Genes que codifican para quimiocinas y quimiorreceptores
RIC	Genes asociados a la respuesta inmune celular
RIC	Genes asociados a la respuesta inmune humoral
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
seg	Segundo
sem	Semana
SOD	Súper Óxido Dismutasa
TI	Genes asociados al tránsito intracelular
TLR-2	Receptor Tipo Toll 2
TNFR	Receptor de TNF
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UNAM	<i>Universidad Nacional Autónoma de México</i>

USDA

United States Department of Agriculture

VS

Genes asociados a vías de señalización celular relacionados con la respuesta inmune

µg

Microgramo

µl

Microlitros

1.0 Introducción

La paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne, es una infección crónica y contagiosa causada por bacilos ácido alcohol resistentes de la especie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*). Se caracteriza por ocasionar enteritis y linfadenitis granulomatosa crónica en los rumiantes tanto domésticos como silvestres. Esta enfermedad tiene una distribución mundial.¹

La paratuberculosis provoca graves pérdidas económicas en la producción cuando los animales están infectados, sobre todo en aquellos que no presentan signos clínicos. Se calcula que los portadores asintomáticos producen 15 a 16 % menos leche comparados con los no infectados. Además, en estos animales existe una reducción de la eficiencia reproductiva al incrementar los días abiertos hasta 28 días.^{2,3} En México, no está bien documentado el impacto económico que tiene la enfermedad; sin embargo, en un estudio realizado por Miranda (2005) en el complejo Agropecuario Industrial en Tizayuca, Hidalgo se demostró que la paratuberculosis genera pérdidas económicas de \$ 10 345 por vaca al año. Esto implicó mermas en la cuenca de \$ 25 411 836 al año. Estas pérdidas están representadas principalmente por una disminución de hasta 47 % de la producción láctea.⁴

La importancia de *M. paratuberculosis* no sólo radica en el impacto económico mencionado anteriormente; este patógeno además, se ha identificado en pacientes con la enfermedad de Crohn en humanos.⁵ Esto es indicativo de un posible problema en la inocuidad alimentaria por parte de la bacteria.⁶ En este contexto, hay reportes de que *M. paratuberculosis* es capaz de sobrevivir a diferentes formas de pasteurización láctea,⁷ sólo se puede reducir la viabilidad de la bacteria en lotes sometidos a altas temperaturas por cortos periodos de pasteurización (65.5°C por 30 min ó 72°C por 25 s).⁸

2.0 Agente etiológico

M. paratuberculosis es un bacilo Gram positivo, ácido-alcohol resistente, aerobio, con un tamaño aproximado de 1 a 2 μm de longitud por 0.5 μm de ancho. Pertenece a la clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae* y es miembro del Complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Este complejo incluye además a *M. avium*, *M. silvaticum*, *M. hominissuis*.^{9,10} *M. paratuberculosis* se distingue de otras micobacterias por su crecimiento lento y por su incapacidad de producir micobactina, por ello, requiere un aporte externo de la misma. También, posee el elemento de inserción IS900, el cual introduce de 14 a 18 copias dentro del genoma de la micobacteria.^{5,11} La temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria es de 37°C; forma colonias pequeñas (1-5 mm), rugosas y generalmente no pigmentadas, visibles a las 4-14 semanas aunque puede alargarse incluso hasta los seis meses o un año dependiendo de la cepa. Se pueden observar estos bacilos en agrupaciones a través de la tinción de Ziehl Neelsen.^{1,10,12}

Existen además características que son comunes con otras micobacterias como la estructura de la pared celular gruesa conformada por cuatro capas. La más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico con cortas cadenas de alanina. Esta capa le da forma y rigidez a la bacteria. La siguiente capa está compuesta por polímeros de arabinosa y galactosa cuya función es mantener en contacto al peptidoglicano con la siguiente capa formada por ácidos micólicos, estos últimos son ácidos grasos de cadena larga derivados de 60 a 90 átomos de carbono en cadenas ramificadas y con un punto de fusión alto. Los ácidos micólicos, le confieren la propiedad de ser ácido alcohol resistentes, le da hidrofobicidad e incrementa la resistencia a varios procesos químicos y biológicos como el cloro y la pasteurización, respectivamente. Por último, la capa más superficial está formada por glicolípidos y lipopolisacáridos

como el lipoarabinomano. Éste último, es capaz de ser reconocido por el hospedador (**Figura 1**).^{10,13}

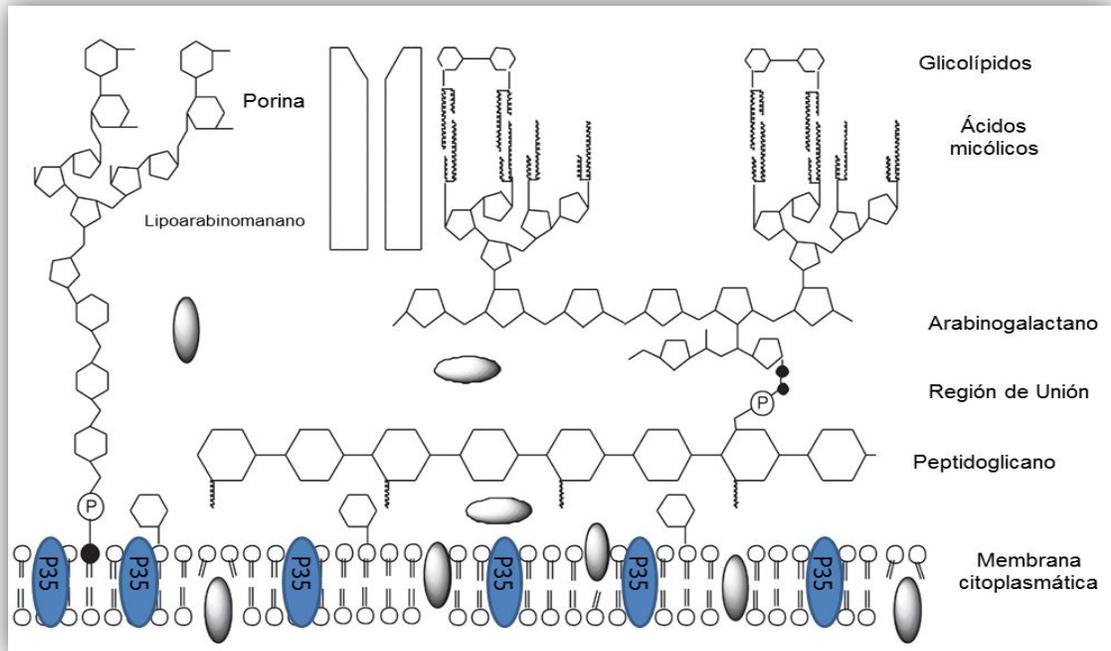


Figura 1. Representación esquemática de la pared micobacteriana. En azul se muestra a la proteína principal de membrana de 35 kDa. Modificado de Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(7):697-714.¹³

3.0 Estructura genómica y proteómica de *M. paratuberculosis*.

M. paratuberculosis posee un genoma circular de 4 829 781 pares de bases (pb) con un contenido de Guanina y Citosina del 69.3 %. Del genoma total de esta bacteria, Bannantine (2005) distinguió mediante ensayos *in silico* un total de 39 proteínas que sólo están presentes en *M. paratuberculosis*.¹⁴

En un análisis proteómico realizado por He y De Buck (2010) se identificó un total de 309 proteínas asociadas a la pared celular y 39 a la superficie celular en *M. paratuberculosis*, todas ellas con diversas funciones (**Cuadro 1**). De las 309 proteínas, el 58.25% fueron identificadas como proteínas de membrana. Por otra parte, 120 proteínas del mismo estudio cuentan con un dominio transmembranal,

18 poseen dos dominios y 25 tienen tres. Asimismo, se encontró un total de 49 proteínas con péptido señal y el 50% de las proteínas expuestas en la superficie de la bacteria cuentan también con este péptido. En la misma investigación, se identificaron 18 proteínas que pueden tener algún papel importante como factor de virulencia de acuerdo a sus características estructurales: HspR, DnaJ, DnaK, KatG, LprG, HtrA, PhoR, PMM, PepA, MmpL3, SdhA, ClpB, HbhA, HBHA, Tuf, GroES, manB y DesA3_2.¹⁵

Cuadro 1. Clasificación funcional de las proteínas identificadas en *M. paratuberculosis* en la pared celular. Tomado de He Z, De Buck J. Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteomic analysis. *Proteome Sci.* 2010;8(21): 1-9.¹⁵

Clase	Función	Superficie Celular	Pared Celular
0	Virulencia, desintoxicación, adaptación.	7	17
1	Metabolismo de los lípidos.	7	29
2	Vías de información.	5	34
3	Pared celular y procesos celulares.	4	65
4	Proteínas PE y PPE.	4	1
5	Intermediarios del metabolismo y respiración.	11	74
6	Proteínas de función desconocida.	0	22
7	Proteínas de regulación.	1	13
8	Proteínas hipotéticas conservadas.	0	54
Total		39	309

Dentro de las proteínas localizadas en la superficie celular de *M. paratuberculosis*, se encuentra la proteína principal de membrana de 35 kDa (P35) codificada por el gen *map2121c*.¹⁶

4.0 Proteína P35 de *M. paratuberculosis*

Este antígeno es denominado proteína principal de membrana debido a que fue purificada a partir de las fracciones de membrana de *M. leprae* (**Figura 1**).¹⁷ También se encuentra en otras especies del género como *M. avium* y *M. paratuberculosis*, pero se confirmó la ausencia de genes que codifican para esta proteína en *M. tuberculosis* y *M. bovis*.¹⁸ Tiene un peso de 35 kDa y está

conformada por 307 aminoácidos.¹⁹ Esta proteína de superficie se expresa en altos niveles cuando la bacteria se encuentra en un ambiente de baja cantidad de oxígeno y alta osmolaridad, condiciones muy similares a la del intestino de los rumiantes. Además, está relacionada con procesos de invasión en células epiteliales del bovino representando un posible factor de virulencia de *M. paratuberculosis*.²⁰

Inicialmente, esta proteína de 35 kDa fue identificada en *M. leprae* como un antígeno inmunodominante, incluso sueros de pacientes con lepra reconocieron a P35, demostrando su inmunogenicidad. Este antígeno, es capaz de estimular la secreción de IFN γ , la expansión clonal de linfocitos T y la producción de inmunoglobulinas IgG en pacientes infectados con *M. leprae*.¹⁸

En el caso de *M. paratuberculosis*, la proteína P35 es capaz de inducir la hipersensibilidad retardada. Esta proteína puede ser utilizada como antígeno candidato en el desarrollo de pruebas diagnósticas en etapas tempranas o como antígenos vacunales contra *M. paratuberculosis* por sus características.²¹

En México, Castrellón (2013) utilizó como antígeno en pruebas de ELISA a la proteína P35 de *M. paratuberculosis* expresada en la superficie del fago M13 recombinante. Se lograron resultados favorables al obtener una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92% de la prueba en muestras de ovinos.²²

5.0 Regulación de los genes que codifican factores de virulencia de *M. paratuberculosis*

La expresión de los factores de virulencia en una bacteria está controlada por diferentes señales en el ambiente como temperatura, bajas concentraciones de hierro, osmolaridad, pH, oxígeno o CO₂. *M. paratuberculosis* es capaz de adaptarse al ambiente en el que se encuentra debido a la regulación de la expresión de los genes relacionados con la composición de su superficie celular.²³

Por ejemplo, las micobacterias que crecen en leche (en condiciones *in vivo*) presentan diferencias en la pared celular asociadas a los lípidos y en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos (*fadE8*, *fadE6* y *map1420*) así como en los genes relacionados con la invasión de las células del hospedador (*map1203*, *lprL*).²⁴

Asimismo, un perfil diferente de lípidos ha sido observado en la superficie de las bacterias intracelulares después de una hora de infección, esto lo hacen por medio de la sobreexpresión de la proteína MAP0482 homóloga de LuxR de *M. avium*. Esta proteína regula la transcripción de diferentes genes involucrados en la motilidad, la formación de biopelículas y genes específicos de virulencia, para establecer la infección en el hospedador. MAP0482 es capaz de sobreexpresar a *fadE* y a *map1420*, involucrados en el metabolismo de los lípidos. De igual manera, aumenta la expresión de *map1203*, asociado a la virulencia, y de *lprL*, una lipoproteína relacionada a la invasión de las células hospedadoras. Por otro lado, es capaz de disminuir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de lípidos, en el transporte de ácidos grasos así como los reguladores transcripcionales *pks12*, *mmpL2* y *map2594*, respectivamente. Debido a esto, se sugiere que MAP0482 está involucrada en la respuesta a las señales ambientales que llevan a cambios en el fenotipo. Esto permite la adaptación de la micobacteria dentro de las células del hospedador.²⁴

Se han descrito más proteínas pertenecientes a la familia de los reguladores transcripcionales que modifican su expresión al exponer a la bacteria bajo condiciones de estrés. Por ejemplo, *sigL* y *sigF* suprimen su expresión al someter a la bacteria a temperaturas de 6°C. Por el contrario, si la bacteria se expone a temperaturas de 65°C, hay una sobreexpresión de los genes que codifican para *sigF*, *sigE* y para *ahpC*.²³

Por otra parte, dentro del genoma de *M. paratuberculosis* existen secuencias que codifican para 19 factores sigma diferentes, los cuales permiten a la ARN polimerasa reconocer a las secuencias promotoras para el inicio de la transcripción de genes asociados al estrés, a la virulencia o los que se expresan de manera constitutiva. Asimismo, en esta bacteria se han descrito regiones promotoras que se caracterizan por tener gran contenido de GC y motivos TGN en secuencias altamente conservadas en la región -10, aunque también se han referido en la región -35.¹¹ En otro estudio realizado por Bannantine *et al.*, se reportaron ocho regiones promotoras que se encuentran corriente arriba en la secuencia consenso -35 TGMCGT (donde M representa C o A) y -10 GGGCCS (donde S representa G o C) respectivamente.²⁵ También, se reportó otra región promotora denominada P_{AN} en esta micobacteria, la cual difiere de ambas secuencias consenso y de los motivos TGN. De manera general, la traducción de señales en las micobacterias tiene una gran cantidad de codones de inicio GTG.¹¹

6.0 Estrategias de *M. paratuberculosis* para la sobrevivencia extra e intracelular

a) Estrategias de sobrevivencia extracelular.

Formación de Biopelículas. Una biopelícula es una comunidad estructurada de células bacterianas encerradas en una matriz polimérica producida por estas bacterias y que además están adheridas a superficies vivas o inertes. Cabe señalar que la formación depende de una compleja interacción entre los microorganismos, la superficie que ha sido colonizada y el ambiente. La formación de biopelículas por bacterias patógenas juega un papel clave en su patogénesis, debido a que induce una fuente de persistencia de la infección, además de permitir la resistencia a antibióticos así como a desinfectantes.^{26,27,28}

El género *Mycobacterium* sp. tiene la capacidad de formar biopelículas. Esta característica ha sido descrita previamente en *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y en *M. avium*. La producción de esta matriz polimérica está asociada a los

glicopeptidolípidos, principales componentes de la pared micobacteriana localizados en su extremo hidrofóbico y que le permiten a la bacteria adherirse a superficies inertes. Estos glicopeptidolípidos son sintetizados en *M. avium* por péptido sintetasas no ribosomales codificadas por los genes *pstA* y *pstB*, contenidas en un operón. Igualmente, se ha reportado que el gen *pstA* contribuye de manera significativa a la habilidad de *M. paratuberculosis* para formar biopelículas, pero también existen otros factores asociados a la elaboración de estas moléculas debido a que cuando se muta el gen, una pequeña cantidad de bacterias aún son capaces de formar esta matriz polimérica. Por otro lado, las proteínas expresadas por este gen contribuyen a la invasión intestinal y además tienen cierto nivel de inmunogenicidad. *M. paratuberculosis* es considerado un patógeno obligado y tiene la característica de sobrevivir por periodos de 200 a 600 días en el ambiente. Esta particularidad facilita la contaminación de camas, ubres, utensilios o pasturas, lo que puede resultar en la ingestión y posterior infección por la bacteria a un hospedador susceptible. *M. paratuberculosis* tiene la capacidad de formar biopelículas, las cuales facilitan la sobrevivencia en el ambiente extracelular por largos periodos.²⁶

En un estudio realizado por Cook *et al.* (2010), se reportó la sobrevivencia de *M. paratuberculosis* en biopelículas sobre bebederos hechos de diferentes materiales por periodos de hasta un año. En los bebederos de concreto y de acero galvanizado se encontraron las biopelículas más concentradas (2×10^5 a 6×10^5 bacterias cm^{-2}). Estas se generaron tres días después de que las micobacterias fueron inoculadas en el agua. Además, se encontró que la micobacteria puede establecer asociación con otros microorganismos dentro de la biopelícula. En conclusión, la producción de una matriz polimérica por parte de *M. paratuberculosis* es una característica que contribuye a la sobrevivencia de la bacteria hasta que pueda ser ingerida por el hospedador adecuado.²⁸

Entrada, adherencia, colonización e invasividad a tejidos del hospedador.

Existen diferentes mecanismos por medio de los cuales *M. paratuberculosis* puede llegar al hospedador adecuado para posteriormente, llevar a cabo la infección de los tejidos del mismo. La principal vía de transmisión es la fecal-oral, a través del consumo de pasturas contaminadas. Además, se ha reportado la transmisión vertical en vacas a partir de la liberación de las micobacterias en leche y calostro, representando una fuente de infección para las terneras que la consumen. También, hay evidencia de la transmisión *in utero* a partir del aislamiento de *M. paratuberculosis* de riñón, hígado, bazo, íleon y linfonodos mesentéricos de fetos provenientes de vacas con paratuberculosis que muestran signos clínicos y de aquellas que no lo muestran. Cabe señalar que el estado nutricional, hormonal, así como la edad de los animales influye en la susceptibilidad de los mismos a la infección. Los neonatos y los animales jóvenes son los más susceptibles.^{3,11}

Una vez que el animal ingiere a *M. paratuberculosis*, esta bacteria viaja por el tracto gastrointestinal hasta llegar al yeyuno o a la región terminal del íleon. Este último, representa el principal portal de entrada del microorganismo debido a que aquí se encuentran gran cantidad de células epiteliales especializadas conocidas como células M, las cuales, recubren a los folículos linfoides de las placas de Peyer. Las células M permiten ingresar a la bacteria hacia la submucosa intestinal, región con gran cantidad de macrófagos y linfocitos, mediante un proceso conocido como transcitosis.^{3,6} Este proceso es dependiente de FAP-P [*fibronectin attachment proteins* (proteínas de unión a la fibronectina)], las cuales son expresadas por *M. paratuberculosis*. En este contexto, la fibronectina es capaz de unirse a las FAP's y a su vez, ambas proteínas se unen a las integrinas presentes en las células M, permitiendo así la invasión.²⁹ También ha sido descrita otra proteína micobacteriana involucrada en el proceso de invasión de las células epiteliales de bovino denominada proteína principal de membrana bacteriana de 35 kDa (P35).^{16,30} Asimismo, se demostró que la NADH-flavina oxireductasa, codificada por el gen *map3464*, también está involucrada en el proceso de

invasión de las células epiteliales de bovino a través de la activación del receptor CDC42 de las células del hospedador.³¹ Con ello, se aprecian los diferentes mecanismos que utiliza la micobacteria para llevar a cabo la invasión intestinal del hospedero.

Una vez que *M. paratuberculosis* ingresa a la submucosa del intestino, se lleva a cabo la fagocitosis de la bacteria por las células presentadoras de antígeno, localizadas en esta región, las cuales sirven como nicho intracelular para la sobrevivencia y multiplicación de la bacteria. Existen diferentes receptores involucrados en la fagocitosis de *M. paratuberculosis*: receptores de manosa, de complemento (CR1, CR3 y CR4), receptores tipo Toll 2 (TLR2), receptores de inmunoglobulinas (FcR), receptores *scavenger* y receptores de fibronectina. Cabe señalar que la opsonización por anticuerpos y por el complemento incrementan el ingreso de las micobacteria dentro de las macrófagos, debido a que son detectados por mayor número de receptores de manera simultánea; sin embargo, la sobrevivencia intracelular de la micobacteria no se ve alterada por este fenómeno.^{6,29}

b) Estrategias para la sobrevivencia intracelular.

Una vez dentro de estas células fagocíticas, la bacteria no provoca el estallido respiratorio, este fenómeno se ha asociado a la actividad de la catalasa y peroxidasa. Por otro lado, este microorganismo es capaz de evitar la maduración de los fagosomas que lo contienen al impedir la acidificación del mismo, así como la adquisición de la GTPasa monomérica Rab7. De manera simultánea, el mismo fagosoma es capaz de retener otras proteínas que están involucradas en el tránsito intracelular en las etapas tempranas como Rab5 y a EEA-1 [*Early endosomal autoantigen 1* (Autoantígeno Endosomal Temprano 1)]. Con ello, evaden la fusión del fagosoma con el lisosoma.^{11,32} Estas particularidades de la bacteria le permiten sobrevivir dentro del ambiente intracelular hostil por la evasión o alteración de la respuesta inmune del hospedador y lo convierten en un proceso crónico.^{3,6,11,29}

Inhibición de la apoptosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que se caracteriza por la fragmentación de ADN, la condensación de la cromatina nuclear, la compactación de organelos celulares y la vacuolización del citoplasma. La regulación de la muerte celular es extremadamente importante para una apropiada defensa contra bacterias intracelulares así como para otras amenazas intracelulares. Algunos patógenos tienen la capacidad de prevenir o inducir la apoptosis y por ende, limitar la detección del sistema inmunológico o favorecer la propagación de estos patógenos a otras células.^{29,33}

En el caso de *M. paratuberculosis*, Kabara y Coussens (2012) reportaron que las células infectadas con esta bacteria tienen actividad reducida de las caspasas 3, 7, 8 y 9, cabe señalar que esta actividad se mantiene aún con el tratamiento de agentes proapoptóticos como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Asimismo, hay una pronunciada disminución en la transcripción de los genes que codifican para las caspasas 3, 7 y 8, pero no para la caspasa 9. Además, se encontró una disminución en la expresión de la proteína BCL2 antagonista de la muerte celular (BAD), de la BAD fosforilada, AKT fosforilada y de MCL-1, proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis. Se concluye que *M. paratuberculosis* posee factores específicos que pueden prevenir la transcripción y la actividad de las caspasas, así como la expresión de proteínas involucradas en la señalización de apoptosis. Esto implica una merma espontánea en la apoptosis de las células hospedadoras, así como una disminución en la sensibilidad a la apoptosis inducida por agentes químicos.³³ En este contexto, se ha reportado que cuando existe sobreexpresión de la IL-10, ésta puede ser la responsable de la reducción en la expresión de los genes que codifican para TNF α , citocina proapoptótica. Además, en un estudio donde se midió la alteración de la expresión del transcriptoma en macrófagos infectados con *M. paratuberculosis*, se encontró una disminución en la expresión de dos genes proapoptóticos: BCL2 antagonista de la muerte celular (BAD) y el receptor de TNF (TNFR) comparado con los no infectados. Asimismo, también se observó un aumento en la expresión del

inhibidor apoptótico BCL2A1. La estimulación de la respuesta antiapoptótica podría permitir a *M. paratuberculosis* persistir de manera exitosa en los macrófagos durante la fase subclínica.³¹

7.0 *M. paratuberculosis* y la respuesta inmune en rumiantes

Respuesta Inmune en Etapas Tempranas. Las células epiteliales y probablemente las células M que tienen contacto con la bacteria son capaces de secretar IL-15, una citocina implicada en la activación y proliferación de linfocitos T y células NK. Esta citocina también se ha asociado como señal estimuladora de los linfocitos T con receptores $\gamma\delta$ intraepiteliales. Estos linfocitos están involucrados en la inmunidad innata y se encuentran en menor proporción comparado con los que contienen receptores $\alpha\beta$ (5:95).³⁴ Las células T $\gamma\delta$ no requieren interacción con las moléculas MHC para su activación, además son la principal fuente de secreción de IFN γ . *M. paratuberculosis* es capaz de activar este tipo de células y por tanto, al secretar IFN γ representa uno de los componentes críticos del hospedador en la respuesta inmune en etapas tempranas para controlar la infección por *M. paratuberculosis*. IFN γ es capaz de activar a los macrófagos y estos a su vez, secretan más citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1, IL-12 e IL-8. Los macrófagos activados disminuyen la expresión de los receptores de transferrina, por lo cual, los niveles de hierro son más bajos. Asimismo, la proteína integral de membrana lisosomal Nramp1 de los macrófagos y monocitos está implicada en el control de la replicación de las micobacterias debido a que disminuye los niveles de hierro del espacio fagosomal disponibles para la bacteria, limitando su crecimiento.^{6,11} Por otro lado, las citocinas TNF α , IL-1, IL-12 e IL-8, son capaces de activar a otros macrófagos y a diferentes tipos de células como los linfocitos T $\alpha\beta$. La activación de estas últimas células lleva a la síntesis y secreción de otra cascada de citocinas como la IL-4, IL-5 e IL-6. Estas últimas están asociadas a la activación de linfocitos B y la producción de IgM. Cabe señalar que simultáneamente a la secreción de IFN γ , hay un cambio en la producción de isotipo de IgM a IgG₁ propiciado por esta citocina proinflamatoria.⁶

Los linfocitos T $\alpha\beta$ también son capaces de producir citocinas como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$, por tanto, tienen la capacidad de activar mayor cantidad de macrófagos. Los macrófagos activados a su vez, después de que han fagocitado a *M. paratuberculosis*, presentan péptidos específicos de la bacteria por medio de las moléculas del MHC de clase II para activar a los Linfocitos T cooperadores Th1, los cuales también secretan citocinas asociadas a la respuesta inmune celular. La activación de los linfocitos T CD4^+ , la producción de citocinas proinflamatorias y la actividad de los linfocitos T CD8^+ , son críticos en el control de la infección por *M. paratuberculosis* en etapas tempranas. Aún no se conoce cómo se lleva a cabo la activación de las células T CD8^+ durante las infecciones tempranas (**Figura 2**).⁶

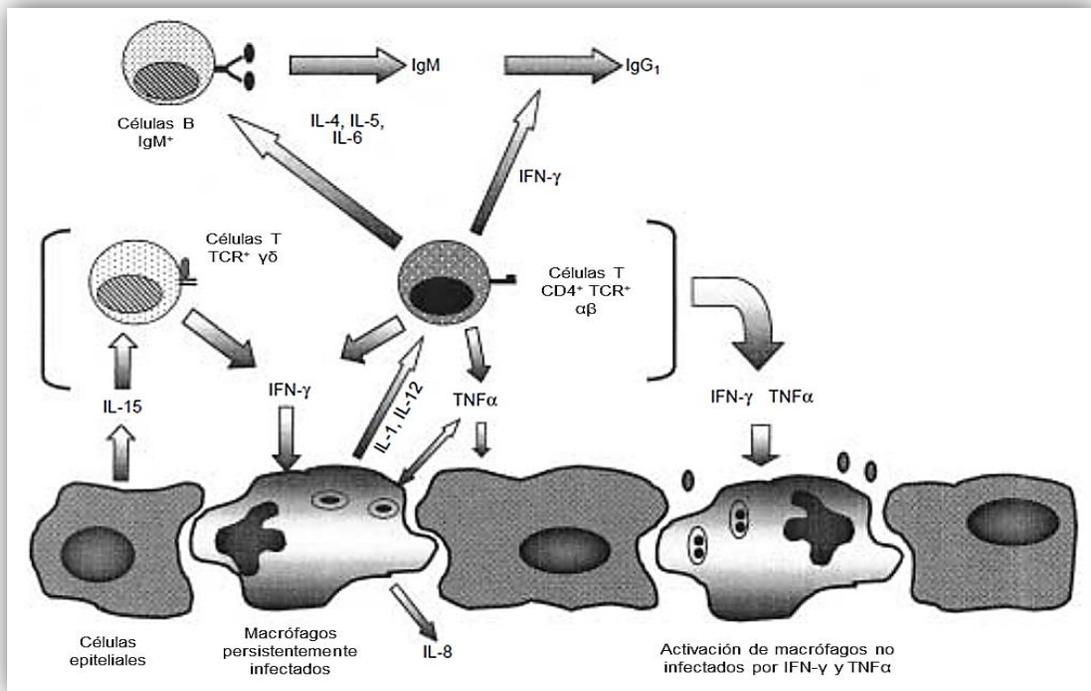


Figura 2. Respuesta inmune en etapas tempranas en células infectadas con *M. paratuberculosis*. El esquema representa el papel clave que las células T $\text{CD4}^+ \gamma\delta$ y $\alpha\beta$ juegan en la respuesta contra *M. paratuberculosis*. Se indica también los diferentes tipos celulares, las citocinas y la interacción entre ellas por la dirección de las flechas. Los pequeños óvalos negros representan a *M. paratuberculosis* y los pequeños círculos negros representan a *M. paratuberculosis* digerida después de la destrucción por los macrófagos. Modificado de Coussens PM. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. Anim Health Res Rev. 2001;2(2):141-61.⁶

Respuesta Inmune en Etapas Subclínicas. *M. paratuberculosis* es más difícil de diagnosticar durante la fase subclínica de la infección. La evaluación microscópica del tejido intestinal de los animales en estas etapas revela la presencia de lesiones granulomatosas compuestas por macrófagos, células epiteloides, células gigantes multinucleadas y linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ son activadas por IL-15, la cual es secretada por las células epiteliales. Los linfocitos T $\gamma\delta$ a su vez, secretan TNF α para activar a los macrófagos. Esta citocina es muy importante para controlar a la infección, pero puede llegar a causar daños colaterales severos a las células del hospedador, por ello, existe una citocina reguladora de la respuesta inflamatoria que es la IL-10. Esta citocina es secretada por los macrófagos activados capaces de destruir a *M. paratuberculosis*.^{6,30}

M. paratuberculosis altera la habilidad de los macrófagos activados para reaccionar a las señales extracelulares de las células T, esto lo hace a través del sistema CD154-CD40. Esto lleva al mejoramiento de la expresión de IL-10 y TGF- β en los macrófagos infectados con esta micobacteria. Debido a que la IL-10 es capaz de suprimir la actividad de las células T, incluyendo a los linfocitos T CD4⁺ $\alpha\beta$, hay una supresión de la respuesta Th1 e IFN γ , lo que favorece la sobrevivencia de la bacteria. La actividad de los linfocitos T CD4⁺ $\alpha\beta$, también puede verse alterada por los linfocitos T $\gamma\delta$ ocasionando un decremento en la secreción de IFN γ . Cabe mencionar que la disminución de la actividad por parte de los linfocitos T CD4⁺ $\alpha\beta$ no es total y por lo tanto, aún son capaces de producir IL-4, IL-5 e IL-6. Estas citocinas ayudan a la activación y proliferación de los linfocitos B de memoria para producir IgG₁, los cuales pueden llegar a ser detectados en pruebas serológicas (**Figura 3**); sin embargo, es importante destacar que los anticuerpos no son capaces de controlar la enfermedad. Por el contrario, al opsonizar a las bacterias pueden exacerbar el cuadro debido a que las micobacterias llegan más rápidamente a los macrófagos y son capaces de infectarlos.^{3,6,29,31}

Por otro lado, también se ha visto un papel importante de las células T CD8⁺ en la infección subclínica de *M. paratuberculosis*. Estos linfocitos pueden eliminar el efecto supresor que tienen las células $\gamma\delta$ sobre las $\alpha\beta$, de tal manera que estos últimos son capaces de secretar nuevamente IFN γ . Además, los linfocitos T CD8⁺ tienen actividad citotóxica sobre los macrófagos persistentemente infectados. Esto conlleva a un deterioro de las células del epitelio intestinal a través de la acción del óxido nítrico, las enzimas proteolíticas, los radicales libres y otros componentes citotóxicos. Al ser lisadas las células persistentemente infectadas, *M. paratuberculosis* es liberada hacia el exterior aumentando así la posibilidad de infectar a otras células (**Figura 4**).^{6,29}

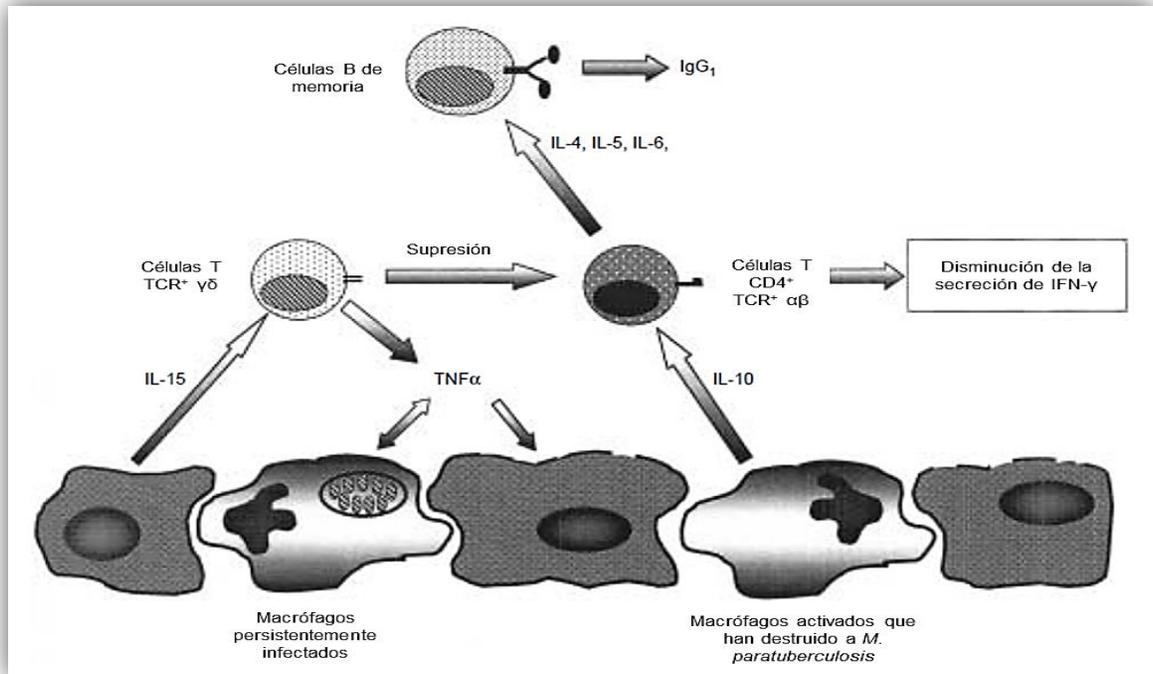


Figura 3. Respuesta inmune en etapas subclínicas en células infectadas con *M. paratuberculosis*. La supresión de la actividad de las células T CD4⁺ trae como consecuencia la reducción de IFN γ . Esta respuesta está mediada por la IL-10 secretada por macrófagos y también por mecanismos que aún no son conocidos de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$. Modificado de Coussens PM. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev.* 2001;2(2):141-61.⁶

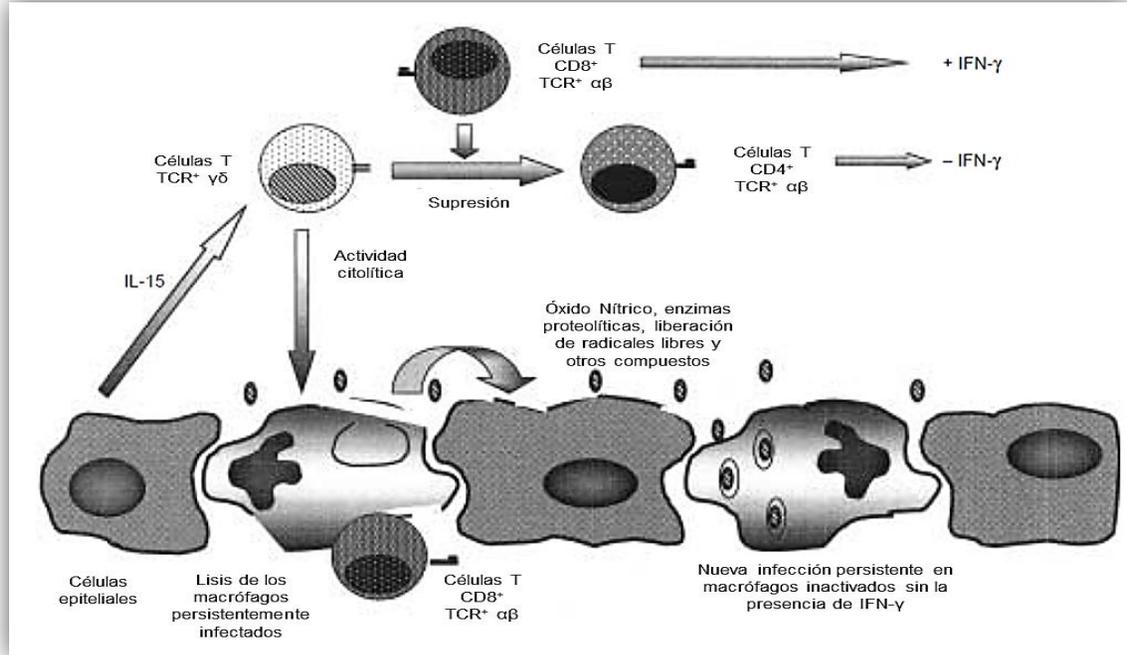


Figura 4. Respuesta inmune en etapas subclínicas en células infectadas con *M. paratuberculosis*. El esquema representa el papel de las células CD8⁺ en la respuesta contra *M. paratuberculosis*. Ésta favorece la lisis de los macrófagos persistentemente infectados y elimina el efecto supresor de las células γδ hacia la actividad de los linfocitos T CD4⁺, por ende, estas células pueden continuar con la secreción de IFN-γ. Tomado de Coussens PM. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. Anim Health Res Rev. 2001;2(2):141-61.⁶

Infección en Etapa Clínica. En esta etapa existe una importante disminución en la respuesta de los linfocitos T CD4⁺. Como estas células están relacionadas con la liberación de citocinas como IL-4 e IL-5, moléculas asociadas a la activación y proliferación de linfocitos B, también puede observarse una disminución en el título de IgG₁ y en la actividad de los linfocitos B. En esta fase, los daños al epitelio intestinal son mucho más severos. Pueden abarcar un área más grande del intestino y ocasionar engrosamiento del mismo debido a las lesiones granulomatosas. Eventualmente, los animales disminuyen de peso debido a la mala absorción y puede llegar a presentarse diarrea. Además, existe hipoproteinemia que genera edema. En esta etapa se detectan mayor cantidad de IgG₁, pero tanto el título de anticuerpos como la excreción de *M. paratuberculosis*

en heces es muy variable. Estos datos son relevantes debido a que pueden afectar a un diagnóstico adecuado.^{3,6,29}

8.0 Uso de microarreglos en la evaluación de la respuesta inmune en rumiantes infectados con *M. paratuberculosis*.

Los microarreglos son un conjunto ordenado de secuencias de ácidos nucleicos de una sola hebra, los cuales son inmovilizados en una superficie sólida que generalmente tiene una extensión pequeña. Estas secuencias se incuban con el material genético proveniente de las muestras a analizar, previamente marcadas con fluoróforos (Cy3, Cy5, Alexa₅₅₅ o Alexa₆₄₇), para permitir la hibridación de las secuencias homólogas con lo cual, se puede determinar de manera simultánea cuáles son los genes que se expresan de manera diferencial en una condición específica.³⁵ La tecnología de microarreglos de ADN fue diseñada inicialmente para medir el nivel de expresión de los transcritos del ARN de miles de genes dentro de un genoma en un solo experimento.³⁶

En los microarreglos donde se utilizan los genes de un hospedador, se puede explorar los niveles de expresión génica del mismo como respuesta ante la infección de un agente patógeno. Esto permite dar una descripción molecular de los eventos que podrían estar sucediendo y también, se pueden identificar patrones de expresión característicos después de la infección en las células del hospedador. Esta información, puede permitir generar un modelo de diagnóstico, pronóstico y manejo clínico de las enfermedades infecciosas.³⁷

Particularmente, en el caso de la paratuberculosis ovina, en un estudio realizado por Smeed JA *et al.* (2010) utilizaron los microarreglos para comparar la expresión génica en el íleon del hospedador entre la presentación paucibacilar y la multibacilar de *M. paratuberculosis* con la finalidad de entender las bases moleculares de la patología. En el estudio encontraron diferentes perfiles moleculares en la transcripción de quimiocinas y receptores de quimiocinas que

pueden generar diversos tipos de infiltrado celular característicos de las dos presentaciones de la paratuberculosis.³⁸

Por otro lado, en el caso de la paratuberculosis bovina, en un estudio hecho por Purdie CA *et al* (2012) usaron los microarreglos para evaluar los perfiles de expresión génica en etapas tempranas (9, 13 y 21 sem p.i.) en infecciones experimentales con *M. paratuberculosis* en ganado de raza Holstein. Ellos encontraron diferencias en la expresión de genes relacionados con la presentación antigénica entre animales infectados y sin infectar.³⁹ También, en un estudio realizado por Khare S *et al* (2012) el análisis de la expresión global de genes de bovinos infectados experimentalmente con *M. paratuberculosis* a través de microarreglos permitió identificar la complejidad de las principales vías relacionadas con la respuesta inmune en la patogénesis de la paratuberculosis, dando evidencia que existe regulación en la expresión génica que conlleva a la modificación de diversas vías metabólicas que contribuyen a la colonización de las placas de Peyer por parte de la micobacteria.⁴⁰ Otro ejemplo, es el estudio realizado por Verschoor CP *et al* (2010) donde se compararon los perfiles de expresión de genes de las células mononucleares de sangre periférica de bovinos Holstein y Jerseys seropositivos a *M. paratuberculosis* a través de microarreglos. Ellos encontraron diferencias de expresión génica entre animales seropositivos y negativos y entre ambas razas en genes asociados en la respuesta inmune, la presentación y procesamiento de antígenos.⁴¹ Estos estudios demuestran la utilidad del uso de microarreglos en la evaluación de la respuesta inmune en rumiantes infectados con *M. paratuberculosis*.

9.0 Diagnóstico

Para llevar a cabo el diagnóstico de la paratuberculosis en un animal clínicamente sospechoso existen diversos métodos como los hallazgos anatomopatológicos, los histopatológicos, las diferentes pruebas de laboratorio como las bacteriológicas (cultivo, tinción Ziehl Neelsen) y las moleculares (PCR), además de otras que

evalúan la respuesta inmune celular (IFN γ e intradermoreacción) y la humoral (ELISA e Inmunodifusión en gel Agar).^{1,2,29}

Hallazgos anatomopatológicos e histopatológicos. Al llevar a cabo una necropsia, se debe exponer la mucosa intestinal para observar el plegamiento y el engrosamiento de la misma. Los linfonodos mesentéricos se encuentran aumentados de tamaño y edematosos. Para confirmar el diagnóstico, es necesario tomar varias muestras de la pared intestinal y de los nódulos linfáticos mesentéricos en un fijador para posteriormente llevar a cabo el examen histológico. Las lesiones típicas de la paratuberculosis consisten en la infiltración de las placas de Peyer, la corteza de los linfonodos mesentéricos, la mucosa y la submucosa intestinal con macrófagos, células epitelioides, linfocitos y en ocasiones células gigantes multinucleadas donde generalmente se encuentran las micobacterias en agregados.^{1,42}

Bacteriología. Se puede utilizar la tinción de Ziehl-Neelsen para detectar a *M. paratuberculosis* a partir de frotis de heces, mucosa afectada y de los cortes superficiales de los nódulos linfáticos. En algunos animales infectados las micobacterias pueden ser escasas o estar ausentes. Por otro lado, se puede cultivar la bacteria a partir de heces, de las áreas engrosadas de la pared intestinal y de los ganglios linfáticos ileales, mesentéricos e ileocecales. Los medios adecuados para el cultivo de *M. paratuberculosis* incluyen el de yema de huevo Herrold, el modificado de Dubos, Löwenstein-Jensen y los medios Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11. Es necesario agregar micobactina para el crecimiento de esta bacteria.¹

Pruebas moleculares. En este tipo de ensayos, se utiliza uno o varios pares de iniciadores que amplifican una secuencia de nucleótidos a partir del ADN bacteriano que codifica para una región génica específica. En el caso de *M.*

paratuberculosis, se utilizan iniciadores que amplifican para una secuencia de inserción denominada IS900 generando un producto de 314 pares de bases (pb).⁴³

Pruebas para la detección de la inmunidad mediada por células. La técnica del IFN γ está basada en la detección de esta citocina secretada a partir de linfocitos sensibilizados con *M. paratuberculosis*. Esta prueba se lleva a cabo mediante un ELISA de tipo sándwich. Por otro lado, dentro de este tipo de pruebas existe la prueba de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado conocida también como prueba de intradermoreacción. Esta prueba se realiza inoculando de manera intradérmica un derivado proteico puro o PPD de origen aviar. Posteriormente, se mide el grosor de la piel 72 horas postinoculación y se compara con el grosor antes de la inoculación. Un aumento del grosor de la piel superior a 2 mm se considera indicativo de la presencia de la hipersensibilidad cutánea de tipo retardado, sugerente a la presencia de paratuberculosis.¹

Pruebas para la detección de la inmunidad humoral. Este tipo de inmunidad, generalmente se detecta entre las semanas 27 y 53 postinfección.⁴⁴ Existe una gran cantidad de pruebas serológicas como la fijación del complemento, pruebas de ELISA e inmunodifusión doble agar (IDGA) que son capaces de detectar anticuerpos contra *M. paratuberculosis* a partir de suero proveniente de animales infectados.¹ En pequeños rumiantes, la sensibilidad y especificidad descritas para la IDGA medidas respecto a los resultados histológicos fueron 99-100% y 24.6 - 56%, respectivamente. Por otro lado, el ELISA comercializado presentó una sensibilidad de 21.9 – 41.5 % y una especificidad de 95 - 99 % en estos animales.^{1,45}

10.0 Estrategias de control

Para llevar a cabo el control de la paratuberculosis, es necesario conocer el estado de infección en un hato, hacer la identificación de las posibles fuentes de infección así como de los factores de riesgo. La mayoría de los programas de

control tienen como objetivo principal reducir las pérdidas económicas, disminuir la excreción de *M. paratuberculosis* por parte de los animales infectados y por tanto, proteger a los hatos no infectados o de alto riesgo. Sin embargo, existen diferentes factores que afectan el desarrollo de un adecuado programa de control como las limitantes de las herramientas diagnósticas disponibles para la identificación de los animales infectados, la habilidad de la bacteria para sobrevivir en el ambiente por aproximadamente un año, así como las malas prácticas de manejo, por ejemplo, mezclar la leche o calostro de animales infectados o la importación de animales procedentes de explotaciones con paratuberculosis.^{2,42,46}

Actualmente, se plantean como estrategias de control de la infección provocada por *M. paratuberculosis*:

- 1) Evaluación y adecuación de las medidas de bioseguridad.
- 2) Diagnosticar y eliminar a los animales positivos.
- 3) Vacunación.^{47,48}

En el primer caso, debe generarse una evaluación de las medidas de bioseguridad, con posterior cambio o adecuación de las mismas, para disminuir la transmisión de la bacteria. Ejemplo de ello es evitar el contacto entre animales infectados y susceptibles, separar a las madres de las crías después de su nacimiento, alimentar a los becerros con calostro libre de paratuberculosis, aumentar el número de novillas de reemplazo en ubicaciones separadas, evitar la fertilización de praderas con estiércol proveniente de animales infectados y eliminar aquellas prácticas que puedan contaminar a la comida o a los materiales que estén en contacto con los animales susceptibles.⁴⁷

Por otro lado, también se puede utilizar un método de control que consiste en diagnosticar y eliminar a los animales positivos. Las pruebas diagnósticas utilizadas con mayor frecuencia para conocer a los animales infectados son ELISA, PCR y cultivo fecal. Los esfuerzos por controlar la enfermedad por medio

de este método, tienen el inconveniente de depender de la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas utilizadas además de que algunas de ellas son costosas, la PCR requiere equipo así como personal especializado y el cultivo fecal tarda varias semanas en ofrecer un resultado. Asimismo, se debe considerar las pérdidas económicas y genéticas que se generan al sacrificar a los animales positivos a paratuberculosis.^{42,43} Por último, se utiliza a la vacunación como estrategia de control.^{47,48}

11.0 Vacunación como método de control contra *M. paratuberculosis*

La vacunación puede ser utilizada como una herramienta en el control de la paratuberculosis debido a que es capaz de disminuir los signos clínicos, la cantidad de animales con lesiones intestinales y la excreción fecal.⁴² Actualmente, existen en el mercado mundial vacunas vivas atenuadas y no atenuadas además de bacterinas con bacterias muertas, sin embargo, en el mercado nacional no hay vacunas disponibles contra la paratuberculosis. La mayoría de estas vacunas tienen diferentes tipos de adyuvantes como la pared micobacteriana, agua en aceite de emulsión como el aceite de oliva, aceite mineral líquido, parafina, entre otros, incluso polvo de piedra pómez, los cuales son capaces de estimular e incrementar la respuesta inflamatoria local y por tanto, mejorar la inmunogenicidad de la vacuna. El objetivo principal de estos productos biológicos es provocar un foco de inflamación de aproximadamente 2 a 5 cm donde los antígenos puedan permanecer estimulando a la respuesta inmune celular del hospedador. Bajo este principio, no es necesaria la revacunación de los animales porque hay una lenta liberación del antígeno en el sitio de vacunación que mantiene estimulando al sistema inmune antes de que el animal presente los signos clínicos. Sin embargo, la presencia de éste nódulo demerita la calidad de la carne.^{42,46,47}

Las vacunas actualmente disponibles en el mercado estimulan principalmente la respuesta inmune celular del hospedador. En los resultados obtenidos por Faisal,

SM *et al.* (2013), al evaluar la respuesta inmune generada en cabras después de la vacunación con la mutante leuD y con Mycopar® y realizar una revacunación a las tres semanas postvacunación, se pudo observar que la vacuna comercial aumenta de manera significativa la producción de IFN γ a las tres semanas postvacunación y a las tres semanas después de la revacunación, llegando a un pico a las 14 semanas postvacunación. Asimismo, encontraron en células mononucleares de sangre periférica un aumento en la transcripción de citocinas proinflamatorias, las asociadas a la respuesta Th1 (IL-6, IL-8, IL-18, e IL-1b) y citocinas Th17 (IL-17). Por otro lado, en estas mismas células, hallaron una disminución en la transcripción de citocinas Th2/antinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13) y de regulación (TGF β) en los distintos tiempos evaluados (de la tercera a la semana treinta postvacunación).⁴⁹

En la **figura 5** se muestra un esquema de los efectos de la vacunación en los diferentes estadios de la paratuberculosis así como un ejemplo de baja infección.⁵⁰

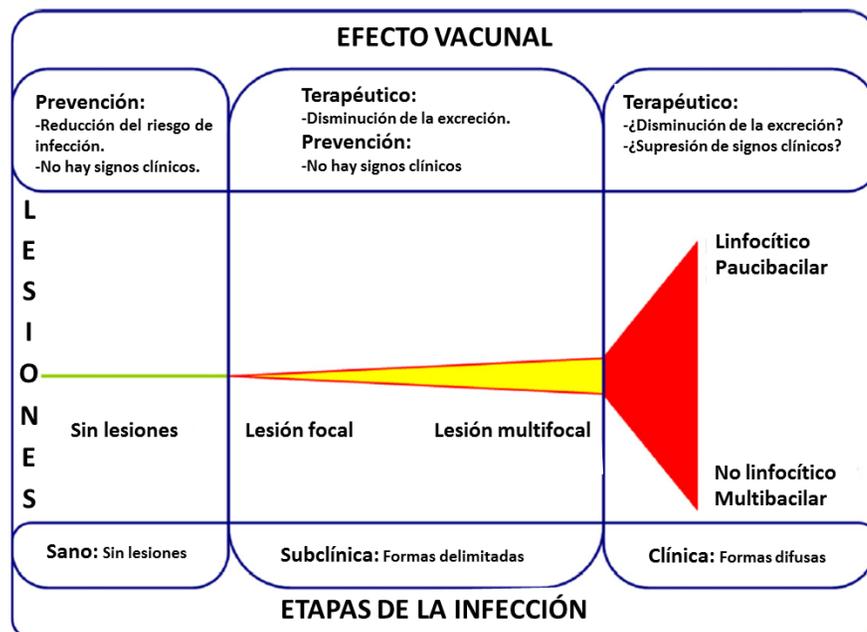


Figura 5. Esquema del efecto de la vacunación en las diferentes etapas de la infección provocada por *M. paratuberculosis*. Modificado de Juste RA. Slow infection control by vaccination: Paratuberculosis. Vet Immunol Immunopathol. 2012; 148(1-2):190-6.⁵⁰

A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, las vacunas poseen también algunos inconvenientes importantes. Ejemplo de ello está el desarrollo de nódulos fibrocáseos debido a una fuerte respuesta inflamatoria en el punto de inoculación que demerita la calidad de la carne. Además, a pesar de que la vacunación induce una respuesta inmune celular y humoral, ésta no confiere una protección absoluta, por tanto, los animales vacunados no eliminan completamente la infección.^{42,46,47,50}

Por último, puede haber interferencia diagnóstica con las pruebas serológicas para el diagnóstico de la paratuberculosis y las pruebas oficiales para detectar tuberculosis en el ganado. La mayoría de las pruebas diagnósticas usadas actualmente dependen de derivados proteicos puros purificados (PPDs) de *M. bovis* (PPDb) y *M. avium* subsp. *avium* (PPDa) pobremente caracterizados y que pueden variar con cada fabricante. Los programas de erradicación de la tuberculosis bovina comparan la reacción de hipersensibilidad cutánea de tipo retardada de estas dos tuberculinas en una prueba de intradermoreacción cervical simple.⁵¹ Debido a que *M. bovis* y *M. avium* subsp. *avium* (*Maa*) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* son genéticamente similares existe una gran probabilidad de que una infección con *M. paratuberculosis* pueda dar respuesta a animales reactivos, lo que afectaría la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas. En un estudio realizado por Barry C *et al* (2011) demostró una estrecha correlación entre el desarrollo de la respuesta inmune de los PPDs utilizados para realizar la estimulación de los linfocitos en la técnica del IFN γ (PPDa, PPDb y PPDj). Además, en este estudio, animales infectados con *M. paratuberculosis* dieron positivos a *M. bovis* con estos reactivos y esta técnica.⁵² Por lo mencionado anteriormente, no se lleva a cabo la vacunación de los animales en los países que tengan un programa de erradicación o control contra la tuberculosis.^{42,47,50}

11.1 Eficacia de la vacunación en el control de la paratuberculosis en diversos países.

Las primeras vacunas contra la paratuberculosis fueron hechas con adyuvantes muy agresivos para el hospedador, por ejemplo, aceite mineral y polvo de piedra pómez, los cuales se adicionaban a bacterias atenuadas y se administraban por vía parenteral. Este producto era aplicado inicialmente en todas las edades e incluía revacunaciones si el tamaño del nódulo no correspondía con el tamaño estándar. En 1960, se obtuvieron resultados prometedores después de administrar la vacuna en Islandia, alcances similares se obtuvieron en Francia en los años 1988 y 1992; sin embargo, debido a la interferencia con las pruebas diagnósticas de la tuberculosis y al enfoque de acción preventiva más que terapéutica, se recomendó la aplicación de la vacuna sólo durante el primer mes de vida.^{46,47}

Actualmente, la vacunación como método de control contra la paratuberculosis es controversial en muchas partes del mundo, debido a que no se ha demostrado la eficacia de las vacunas disponibles en el mercado en evitar el riesgo de infección y transmisión del organismo.⁵³ Sin embargo, diversos países donde vacunan contra la enfermedad como Islandia, Australia, España, los Países Bajos, Francia, Noruega, India, Nueva Zelanda, Chipre, Reino Unido y Estados Unidos, los animales mostraron disminución de los signos clínicos en etapas avanzadas.^{46,54}

Por ejemplo, desde 1998 en Australia se implementó el Programa Nacional para el Control de la Paratuberculosis en Ovinos, dividida en diferentes etapas. En el primer periodo (1998 al 2004), se evaluó la incidencia y prevalencia de la infección, además, en el 2002 se autorizó la vacuna de la marca Gudair® (Pfizer Animal Health®) utilizada en este programa de control; la vacuna contiene a la cepa 316F de *M. paratuberculosis* inactivada con calor y aceite mineral como adyuvante. En el segundo y tercer periodo (2004 al 2012), se realizó un mayor énfasis en el control de la infección por medio de la inmunización al proporcionar subsidios en

los programas de vacunación en algunos estados de Australia.⁵⁵ La vacuna aplicada entre los 3 y 8 meses de edad en ovinos, mermó la incidencia de mortalidad hasta un 90% (de 400 animales, hubo una mortalidad de 80 controles y 7 ovinos vacunados), así como la excreción fecal de *M. paratuberculosis*, generando así una disminución de las pérdidas económicas ocasionadas en hatos con alta prevalencia.^{46,53,55,56} En el periodo del 2013 al 2018, no se tiene contemplado apoyo financiero para subsidios en los programas de vacunación; sin embargo, el plan promueve el uso de la misma, ya que es la única herramienta disponible para reducir la manifestación clínica de la enfermedad así como la excreción de la bacteria por ovejas infectadas.⁵⁷

En el caso de Islandia, la inmunización en ovinos es obligatoria desde 1966 en zonas donde está presente la infección. Por otro lado, los bovinos, nunca han sido vacunados contra la paratuberculosis en este país. Se utiliza la vacuna de Sigurdsson, la cual consiste en dos cepas de *M. paratuberculosis* inactivadas con calor suspendidas en partes iguales de aceite mineral y de oliva. La vacunación contra la paratuberculosis redujo 90% de la mortalidad en ovinos ocasionada por la bacteria. Actualmente, las pérdidas económicas generadas por la paratuberculosis en Islandia son mínimas. La enfermedad no ha sido diagnosticada en ciertos distritos por más de diez años y la vacunación ha sido frenada en estas áreas.⁵⁸

En el caso de Estados Unidos, a pesar de que la vacunación ha sido documentada desde 1926, no es ampliamente utilizada en este territorio; sólo 21 estados permiten la vacunación y la mayoría de las vacunas se emplea en Iowa y Wisconsin.⁵⁹ Actualmente, sólo está permitida la aplicación de la vacuna Mycopar® (Boehringer Ingelheim®) la cual está conformada por la bacteria *M. paratuberculosis* inactivada con calor y suspendida en aceite mineral como adyuvante.⁴⁶ Únicamente se vacunan a novillas y terneros de reemplazo entre uno y 35 días de edad que sean parte del programa estatal del control de la

paratuberculosis, programa gestionado por *United States Department of Agriculture* (USDA). La distribución y administración de este producto en cada estado está limitado a los veterinarios designados por los funcionarios estatales de salud animal.^{46,60} Para llevar a cabo la vacunación, se deben cubrir varios requisitos previamente:

1. Confirmar la presencia de hatos infectados con *M. paratuberculosis* por medio de cultivo fecal o por PCR.
2. Todos los animales deben ser negativos a la prueba de tuberculina.
3. Los propietarios de los hatos y la Agencia Estatal de Salud Animal deben firmar un convenio para el uso de la vacuna.

Esta vacuna es capaz de disminuir los signos clínicos, la excreción de *M. paratuberculosis* en heces así como la carga bacteriana en los tejidos afectados.⁴⁶

El uso de la vacunación contra la paratuberculosis en los diferentes países ha sido capaz de mermar las pérdidas económicas debido a la disminución de los signos clínicos y de la excreción fecal de la bacteria. Sin embargo, todas las vacunas empleadas reportan que no son capaces de prevenir nuevas infecciones. La eficacia podría depender de la edad en que los animales fueron expuestos y vacunados, la carga de micobacterias en el ambiente así como el manejo del hato para reducir el riesgo de transmisión. Además, todas las vacunas interfieren con el diagnóstico de la tuberculosis y pueden llegar a ocasionar lesiones granulomatosas en las personas en caso de autoinoculación, las cuales sólo pueden tratarse mediante cirugía.^{46,55,56,58,59}

En México, la vacunación contra la paratuberculosis en bovinos y pequeños rumiantes no se realiza ya que la vacuna no está disponible en el mercado, además de que los productos biológicos producidos actualmente interfieren en el diagnóstico de la tuberculosis a través de las técnicas propuestas por la Campaña

Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*M. bovis*) al emplearse un inmunógeno que comparte epítopes entre los agentes causales de la tuberculosis y la paratuberculosis.⁴⁷ Asimismo, se debe considerar que uno de los requisitos para la exportación del ganado bovino castrado a los Estados Unidos por los 5 estados y 19 regiones de baja prevalencia de la tuberculosis bovina en México reconocidos por la USDA, es que las pruebas diagnósticas para la tuberculosis sean negativas.⁶¹ Esta restricción comercial es una limitante más para que no se emplee la vacunación contra la paratuberculosis en México.⁶²

11.2 Desarrollo de nuevas vacunas contra la paratuberculosis

Debido a las desventajas mencionadas anteriormente, existe en la actualidad la necesidad de crear nuevas vacunas contra la paratuberculosis. Se han evaluado vacunas de ADN donde se inoculan vectores de expresión que contienen los genes de *M. paratuberculosis*. Estas vacunas han sido probadas en ratones, humanos y en ovejas, pero no en bovinos. Otros biológicos desarrollados están compuestos por bacterias sonicadas y fracciones de células bacterianas, pero han demostrado un grado mucho menor de protección.⁴⁷ Además, también se han evaluado diversos antígenos recombinantes de *M. paratuberculosis* en diferentes especies, por ejemplo, la proteína de choque térmico de 70 kDa (MAP Hsp70),⁶³ el combinado proteico conformado por las proteínas 85A, 85B, 85C y SOD en bovinos⁶⁴ y 85A, 85B, SOD y Map74F en cabras.⁶⁵ Estos antígenos disminuyeron la excreción en heces e indujeron una respuesta Th1 del hospedador, pero todos están presentes en el complejo tuberculosis.⁶⁶ Otro antígeno evaluado es la proteína P35, la cual es capaz de estimular la producción de IFN γ y de óxido nítrico en ratones. Esta proteína tiene la ventaja de que no está presente en *M. bovis* ni en *M. tuberculosis*.²¹

Dentro del desarrollo de antígenos recombinantes, el despliegue de péptidos y proteínas en fagos filamentosos es una novedosa herramienta para el diseño de vacunas recombinantes. Con esta técnica, se permite la creación de fagos

recombinantes que expresan a los antígenos vacunales en su superficie.⁶⁷ Las partículas del virus tienen varias características que le dan ciertas ventajas sobre otros métodos de vacunación, por ejemplo, las vacunas de fagos son baratas y pueden reproducirse fácilmente a gran escala; son altamente estables en pH de 3 a 11 en un periodo de 24 h y pueden estar a temperatura ambiente por más de seis meses o por más de seis semanas a 63°C.⁶⁸ Asimismo, no se han reportado efectos adversos relacionados con la aplicación de fagos recombinantes en humanos. Además, las partículas del fago son altamente inmunogénicas, éstas son reconocidas por las células presentadoras de antígeno y posteriormente son procesadas usando tanto la vía endocítica como la citosólica, por tanto, son capaces de acoplarse tanto a las moléculas del MHC de clase I y de clase II lo que conlleva a la activación de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente; también se ha visto que es capaz de inducir la respuesta linfocitos B en ratones.⁶⁹ Con estas características, se ha demostrado que este tipo de vacunas no requieren de adyuvantes.^{70,71} Actualmente, no existen vacunas de fagos recombinantes desarrolladas contra la paratuberculosis, por lo tanto, representa una buena alternativa dadas las ventajas que posee.

12.0 Justificación

A pesar de que la paratuberculosis está presente en México, no se han establecido medidas oficiales para su diagnóstico y control. La vacunación en pequeños rumiantes no se lleva a cabo porque no hay una vacuna disponible en el mercado mexicano y las existentes en el mercado mundial no han sido autorizadas debido a que no hay certeza de que se haga un uso exclusivo para estas especies.⁴⁸

Por otro lado, la vacunación en bovinos no ha sido autorizada en México debido a que ésta interfiere con las pruebas diagnósticas de la tuberculosis bovina y en la exportación de estos animales.^{50,61} En consecuencia, existe la necesidad de contar con nuevos productos biológicos contra la paratuberculosis que no interfieran con las pruebas diagnósticas para determinar la presencia de la tuberculosis. En este sentido, la proteína P35, presente sólo en *M. avium*, *M. paratuberculosis* y *M. leprae*, es capaz de estimular la respuesta inmune celular y no interfiere con el diagnóstico de la tuberculosis, siendo un buen candidato como vacuna contra la paratuberculosis.^{18,21}

El método de despliegue en fago permite la obtención de gran cantidad de partículas proteicas de P35 a bajo costo y además, son estables para su almacenamiento y transporte.^{22,69} Asimismo, las partículas del fago filamentoso son inmunogénicas *per se*, debido a que son capaces de activar a las células T cooperadoras y a los linfocitos B, por tanto, no necesitan el uso de adyuvantes durante la inmunización.^{69,70,71}

En bovinos, el análisis de la expresión global de genes de los animales infectados con *M. paratuberculosis* a través de microarreglos ha permitido identificar la complejidad de las principales vías relacionadas con la respuesta inmune en la patogénesis de la paratuberculosis.⁴⁰ Por tanto, al hacer el análisis del

transcriptoma de los animales infectados y vacunados se podrá identificar el efecto vacunal dentro de estas vías.

13.0 Hipótesis

La aplicación como vacuna de la proteína P35 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* expresada en el fago M13 recombinante, modificará la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune en etapas tempranas, en leucocitos de ovinos infectados naturalmente con esta bacteria.

14.0 Objetivo

Evaluar la expresión génica de leucocitos, a través de microarreglos, en ovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vacunados con el fago P35 recombinante para identificar los cambios en la expresión de los genes y de las vías asociadas a la respuesta inmune.

15.0 Materiales y Métodos

Diagrama de flujo del procedimiento experimental (Figura 6).

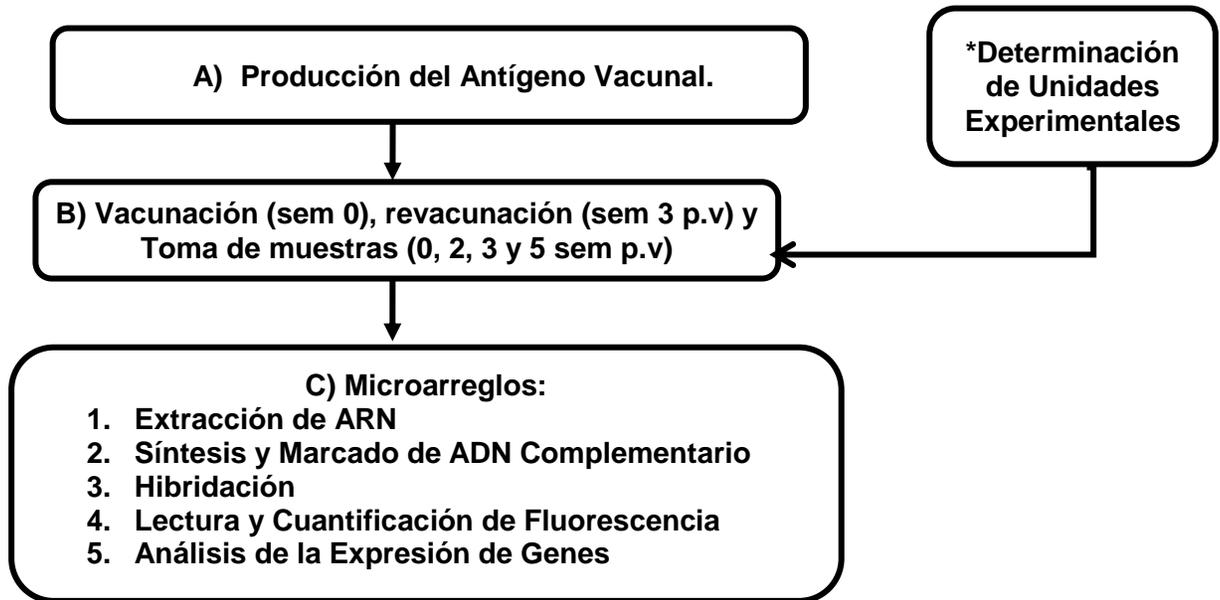


Figura 6. Diagrama de flujo en donde se muestra la metodología que será utilizada para el trabajo experimental.

Crecimiento y purificación del fago M13 recombinante que expresa la proteína P35 de *M. paratuberculosis*. Este procedimiento se realizó en la Planta Piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la obtención del fago P35 recombinante, se utilizó la bacteria *E. coli* TG1 la cual contiene el fágemido pG8SAET, éste posee un sitio múltiple de clonación, que incluye sitios de restricción para las enzimas NcoI y SnaBI, en el cual se insertó el gen de la proteína P35. Asimismo, este fágemido cuenta con una secuencia para la etiqueta E, la cual marca y permite identificar a la proteína de interés debido a que la etiqueta se expresa únicamente cuando la proteína se traduce de forma correcta al haber un cambio en el marco de lectura una vez que se agrega un inserto al vector. Además, posee el gen de la proteína pVIII propia del fago, donde se une la proteína P35 cuando ésta se expresa; también contiene un casete de resistencia a ampicilina que permite seleccionar aquellas clonas que contienen el fágemido (Figura 7). En la Figura 8 se muestra

las posiciones donde se alinean los iniciadores dentro del sitio de clonación múltiple del vector.²²

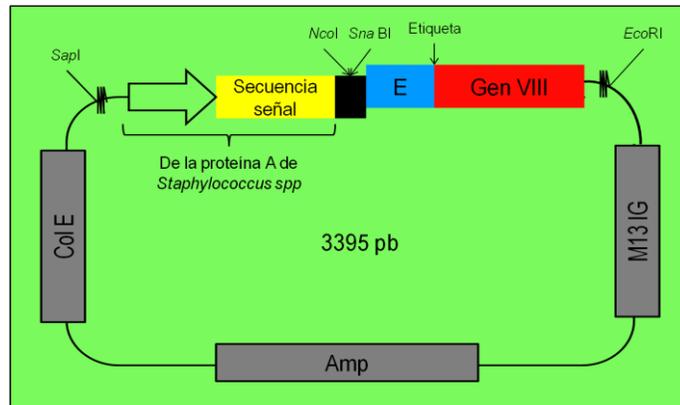


Figura 7. Esquema del vector *pG8SAET* empleado en la clonación del gen *p35*. En el esquema se muestran las características del vector: casete de resistencia a antibiótico (*Amp*); el sitio múltiple de clonación (negro); la etiqueta *E* (azul), que se expresa únicamente al traducirse la proteína de interés; la proteína *pVIII* (rojo) propia del fago donde se une la proteína *P35*. Tomado de: Castellón AVE. Expresión de la proteína recombinante *P35* de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y su uso en diagnóstico de paratuberculosis en ovinos. Tesis de Maestría. México D.F.: FMVZ-UNAM, 2013.²²

Las clonas con las características previamente descritas que contienen el gen *p35* de *M. paratuberculosis* utilizadas en este estudio, fueron obtenidas previamente en el estudio de Castellón (2013).²² A partir de estas clonas se realizó el despliegue en fago filamentoso. Brevemente, la clona 5, se sembró en agar Luria Bertani, también denominado LB con ampicilina (*Amp*) [100 µg/ml] (10 g Bacto triptona, 5 g extracto de levadura y 10 g NaCl, 15 g agar-agar c.b.p. 1 L; pH 7), y se incubó a 37°C por 18 h. Posteriormente, se sembraron todas las bacterias del agar en 400 ml de medio 2xYT con *Amp* [100 µg/ml] (BD DIFCO®) y se incubó nuevamente a 37°C en agitación continua (250 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a una $\lambda=600$ nm. La densidad óptica fue medida por medio de un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys®5). A continuación, se agregó al inóculo 630 µl de Fago *helper* M13K07 con un título de 1×10^{11} UFP/ml (Invitrogen®) obteniendo una MOI de 3:1 (tres fagos por cada bacteria); se incubó durante 30 min a 37°C sin agitación y posteriormente, el cultivo se colocó en esterilidad en 10 L de medio

2xYT estéril con *Amp* [100 µg/ml] y kanamicina (*Kna*) [50 µg/ml] en un biofermentador (Microgen Fermentor/New Brunswick Scientific Co. Inc.®) incubando nuevamente a 37°C con agitación continua (350 rpm) durante 16.5 h.

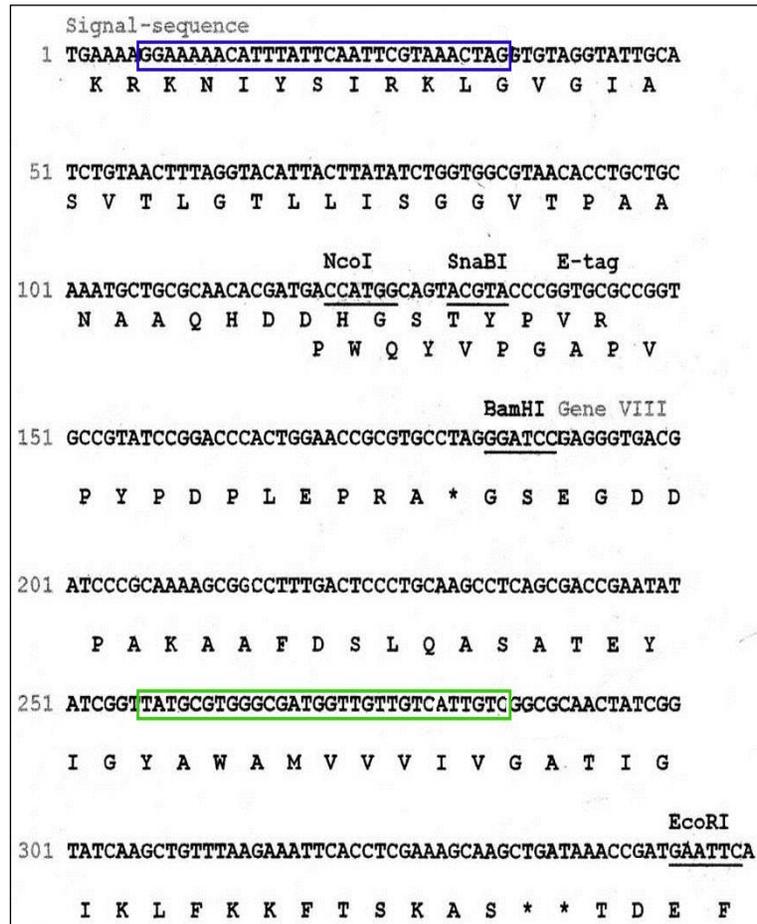


Figura 8. Secuencia del sitio múltiple de clonación del vector pG8SAET. En las secuencias se subrayan algunos de los sitios de restricción con los que cuenta el vector, donde se incluyen a *NcoI* y *SnaBI* los cuales fueron empleados en la clonación del gen *p35*, así como el cambio de marco de lectura que permite la expresión de la etiqueta E. En azul la secuencia del iniciador *pYSAET* y en verde la secuencia del iniciador *F80LI*, los cuales se emplearon en la secuenciación del gen clonado. Tomado de: Castellón AVE. Expresión de la proteína recombinante P35 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y su uso en diagnóstico de paratuberculosis en ovinos. Tesis de Maestría. México D.F.: FMVZ-UNAM, 2013.²²

El cultivo fue colectado del biofermentador, centrifugado para retirar la biomasa y esterilizado en autoclave a 15 lb de presión, a 121°C por 20 min. Posteriormente,

el cultivo se colocó en tubos de boca ancha con capacidad de 500 ml, estos se centrifugaron a 8000 *g* por 20 min a 4°C y se colectó el sobrenadante. Éste se colocó en una botella de 9 L y se agregó 1/6 del volumen recuperado de polietilenglicol al 20% (PEG al 20%) [2.5 M NaCl, Polietilenglicol al 20% c.b.p. 1 L de agua MiliQ], se homogenizó y se mantuvo a 4°C toda la noche. Después, se centrifugó a 10 000 *g* por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla generada se dejó secar. Por último, las pastillas obtenidas se suspendieron en TBS (150 mM NaCl, 50 mM Trizma HCl c.b.p 100 ml de agua MiliQ pH 7.5) consiguiendo un volumen final de aproximadamente 450 ml. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Se realizaron las titulaciones del fago después de tres pasos: al colectarlo del biofermentador, después de la esterilización y después de la precipitación. El primer paso para llevar a cabo cada una de las titulaciones fue realizar diferentes diluciones del mismo (de la dilución 10^{-2} a 10^{-12}). De manera simultánea, se incubó 5 ml de cultivo de *E. coli* TG1 sin transformar en medio 2xYT a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0.7 a 1. Posteriormente, se realizó una infección de 200 μ l de cultivo de *E. coli* TG1 con 50 μ l de las diferentes diluciones empleadas. A continuación, los cultivos infectados con el fago se incubaron a 37°C por 40 min. Después, se sembraron 100 μ l de cada uno de los inóculos en agar LB con Cb [100 μ g/ml] y se incubó de 18 a 20 h a 37°C. Por último, se realizó el conteo de las UFC, en la dilución 10^{-12} se pudo realizar este conteo.²²

Cuantificación de proteínas. La determinación de la concentración de proteínas en cada muestra se realizó con el método de Bradford utilizando un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech®, Ultrospec 3000) a una longitud de onda de 595 nm. Este método consiste en realizar una curva de referencia utilizando albúmina sérica bovina al 1% quedando como concentraciones finales de la albúmina 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ g/ μ l. Una vez obtenida la curva, se hizo la cuantificación de cada una de las muestras, para ello, se agregaron 50 μ l de la

muestra en 50 µl de agua MiliQ y 1 ml del reactivo de Bradford (100 mg de Azul de Coomassie G-250, 50 ml de Etanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85%) en una cubeta del espectrofotómetro, se incubó por 5 min en oscuridad y se hizo la lectura. Como control se utilizó 1 ml del reactivo de Bradford.⁷²

Selección de Unidades Experimentales. Las unidades experimentales que se utilizaron en el estudio fueron establecidas de acuerdo a los resultados obtenidos al procesar 127 muestras de sangre y heces de ovino de un muestreo previo realizado en noviembre del 2014 en el módulo de producción de ovinos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la FMVZ-UNAM, ubicado en el Km 8.5 de la carretera Tequisquiapan, Ezequiel Montes Querétaro.⁷³ Este módulo cuenta con antecedentes de paratuberculosis descritos en un estudio realizado por López en el 2014, donde se encontró una seroprevalencia de 39.41% utilizando la prueba ELISA Maa.⁷⁴

Las pruebas realizadas para las muestras colectadas fueron la PCR IS900 a los leucocitos obtenidos a partir de las muestras de sangre para conocer si había presencia de ADN de *M. paratuberculosis* en ellas; además, se hicieron ensayos de ELISA P35 para determinar la presencia de anticuerpos contra esta micobacteria. Por otro lado, a las muestras de heces se les realizó la tinción de Ziehl Neelsen para distinguir a los bacilos ácido alcohol resistentes. Los animales seleccionados para este trabajo, fueron positivos a dos o más pruebas. Con base a este criterio, se seleccionaron a tres ovinos hembras de raza Suffolk y cruce de 5 años de edad para ser inmunizadas con el fago P35 recombinante.

Inmunización y toma de muestras. La vacunación se realizó por vía subcutánea, en el costado lateral derecho a tres dedos de la espina de la escápula. Se aplicaron 2 ml [0.2 mg] del fago P35 recombinante. Los animales se regresaron al rebaño original después de la inoculación. A la tercera semana postvacunación, se

realizó la revacunación de los ovinos con el mismo inóculo y la misma dosis utilizada, pero del lado contrario de donde se hizo la primera inmunización.

A las 0, 2, 3 y 5 semanas postvacunación se tomaron muestras de sangre a partir de la vena yugular usando tubos con sistema de vacío Vacutainer® con EDTA, para realizar PCR IS900 y ELISA P35; así como muestras de heces para llevar a cabo la tinción de Ziehl Neelsen, esto con el fin de monitorear el estado de los animales con respecto a la enfermedad. Simultáneamente, se evaluó la condición corporal y la formación de nódulos postvacunación. La condición corporal de las borregas fue realizada por una sola persona palpando la región lumbar con las dos manos para establecer, de manera aproximada, la cantidad de grasa subcutánea y músculo y clasificarlas dentro de la siguiente escala:

Condición corporal 1 (CC1): La parte espinosa y transversa de las vértebras se siente y visualiza con gran facilidad, la cantidad de músculo es muy poca y la de grasa es mínima o inexistente, los huesos de la pelvis también son visibles.

Condición corporal 2 (CC2): Estos animales aún tienen poco peso, las vértebras en sus porciones espinosas y transversas se tocan con facilidad, aunque ya se siente una mayor cantidad de músculo y algo de grasa a diferencia de la CC1.

Condición corporal 3 (CC3): La cantidad de músculo y grasa que hay entre las apófisis espinosa y transversa es moderada. Las vértebras ya no se sienten tan fácilmente, se requiere de una ligera presión en la zona para poder palparlas.

Condición corporal 4 (CC4): En estos animales, existe una mayor capa de grasa sobre el músculo. Las apófisis de las vértebras se pueden sentir al hacer presión sobre ellas.

Condición corporal 5 (CC5): Al momento de tocar el lomo de estos animales, no se sienten las vértebras aún ejerciendo presión sobre ellas. El animal está totalmente cubierto de grasa.⁷⁵

Para evaluar la formación de nódulos en el sitio de inoculación se palpó el mismo y se midió con un vernier. Por otro lado, se colectaron muestras de sangre para realizar la extracción de ARN en la semana 0, 2 y 5 postvacunación.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de ADN de *M. paratuberculosis* en muestras sanguíneas. En primer lugar, se obtuvieron los leucocitos a partir de la sangre de los ovinos realizando lavados con un buffer de lisis de eritrocitos (320 ml de dextrosa, 5 ml de MgCl₂, 10 ml de Tris HCl 1M, 1ml tritón x-100, c.b.p. 1 L; pH 7.5). Posteriormente, se realizó la extracción del ADN de las células obtenidas utilizando el producto comercial *EZ-10 spin column genomic DNA, minipreps kit*® (Qiagen®) siguiendo las recomendaciones del productor. A continuación, con el ADN extraído se realizó la reacción de PCR usando el producto comercial *FastStart PCR Master*® (Roche®) de acuerdo a las instrucciones del productor. Se utilizaron los iniciadores IS900 3N -5': GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG3' e IS900 5N -5': ATT TCG CCG CCA CCG CCA CG3'. Estos iniciadores amplifican la secuencia de inserción IS900, específica de *M. paratuberculosis*. Las condiciones utilizadas en el termociclador Px2 Thermal Cycler® (Thermo Electron Corporation®) para llevar a cabo la amplificación de las muestras fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min y 35 ciclos de 94 °C por 40 seg, 67 °C por 40 seg, 72°C por 40 seg, con una extensión final de 72°C por 5 min hasta concluir con 4°C. Se generó un producto de 314 pb.⁴³

Inmunoensayo Enzimático P35 (ELISA P35). Se empleó esta técnica para la cuantificación de anticuerpos contra *M. paratuberculosis* en los 127 animales del ható para establecer las unidades experimentales, así como de los animales de este estudio. Se utilizó un punto de corte de 0.6, establecido en el trabajo de

Castrellón (2013).²² Brevemente, las placas fueron sensibilizadas con el antígeno P35, para ello, la proteína P35 fue cuantificada por medio del método de Bradford. Después, se colocó 100 µl del antígeno P35 a una concentración de 20 µg/ml diluida en buffer carbonato (5.3 g Na₂CO₃, c.b.p 1 L de destilada pH 9.6) por pozo, se cubrió la placa y se incubó durante 8 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó el antígeno de la placa y se hicieron tres lavados a cada pozo con 200 µl de PBS-Tween 20 al 0.1% (100 ml PBS 10x (80 g NaCl, 2 g KCl, 21.72 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, c.b.p 1 L de agua MiliQ), 900 ml de agua destilada y 1 ml de Tween 20).

Una vez sensibilizadas las placas, se llevó a cabo el bloqueo de las mismas colocando 150 µl a cada pozo de PBS-Gelatina al 1% (10 ml PBS 10x, 90 ml de agua destilada y 1 g de gelatina), se cubrió la placa y se incubó por 90 min a temperatura ambiente. Después, se eliminó el PBS-Gelatina al 1% de la placa y se realizó tres lavados a cada pozo con 200 µl de PBS-Tween 20 al 0.1%. A continuación, se hizo una dilución 1:1600 de cada uno de los sueros control y los problema (1 µl suero + 1.6 ml de PBS) y se homogeneizó en el vórtex. Inmediatamente, se colocó 100 µl de cada suero diluido por pozo, cada muestra se puso por duplicado, se cubrió la placa y se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó el suero diluido de la placa y se realizó tres lavados a cada pozo con 200 µl de PBS-Tween 20 al 0.1%. Luego, se colocó 100 µl a cada pozo del conjugado Anti-IgG cabra marcada con peroxidasa de rábano (SIGMA-ALDRICH®) utilizando una dilución 1:1000, se tapó la placa y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se desechó el conjugado de la placa y se hicieron 3 lavados a cada pozo con 200 µl de PBS-Tween 20 al 0.1% y 2 lavados a cada pozo con PBS, dejando incubar por 2 min entre cada lavado con éste reactivo.

Simultáneamente, se preparó la solución de revelado mezclando los reactivos en el siguiente orden: 50 ml de buffer citrato 0.05 M (*Solución A*: 22.97 g C₆H₈O₇,

c.b.p 1 L de agua destilada; *Solución B*: 29.41 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, c.b.p 1 L de agua destilada; mezclar 600 ml solución A + 479 ml solución B, c.b.p. 2 L de agua destilada), 5.48 mg ABTS (SIGMA-ALDRICH®) y 38 μl de solución 1/25 de H_2O_2 estabilizado al 30% (10 μl H_2O_2 de 30% v/v, 120 μl de agua destilada). Se agregó 100 μl a cada pozo de esta solución, se cubrió la placa y se incubó por 40 min a temperatura ambiente. Por último, se realizó la lectura de las absorbancias en el lector de placas de ELISA (BioTek®).

Procesamiento de muestras de heces. Para procesar cada una de las muestras de heces de animales inmunizados con P35 se pesaron 2 g de heces y se colocaron en un tubo tipo Falcon de 50 ml. En esterilidad, se añadieron 38 ml de N-cetil-piridinium (HCP) al 0.75 % (7.5 g de N-cetil-piridinium c.b.p 1 L de agua destilada). Posteriormente, se homogenizaron perfectamente cada una de las muestras agitando durante 30 segundos o hasta que el material más grosero se desintegrara. Se dejaron reposar los tubos durante toda la noche (8-10 h) y después, con una pipeta Pasteur desechable, se recogieron aproximadamente 3 ml de homogeneizado de la interfase del tubo Falcon que se dejó reposar toda la noche.

Tinción de Zielh-Neelsen. Se colocó una gota en un portaobjetos por muestra de heces de la interfase colectada previamente con la pipeta Pasteur. Luego, se dejaron secar a temperatura ambiente y ya secas, se fijaron con calor. Posteriormente, se colocaron todas las muestras en fucsina fenicada (261 ml de fucsina básica, 14 ml de fenol). Después, se lavó cuidadosamente con agua destilada; se decolora en alcohol ácido (267 ml de alcohol al 95%, 8 ml HCl, c.b.p. 275 ml de agua destilada) durante 3 min y nuevamente, se lavó hasta quitar el excedente de alcohol ácido. A continuación, se contrastó con azul de metileno por 20 min y se realizó un lavado final con agua destilada. Finalmente, se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente el tiempo necesario y se realizó

montaje empleando cubreobjetos y una gota resina para su posterior observación en el microscopio óptico.

Extracción de ARN. El ARN total fue extraído a partir de la sangre obtenida de los animales vacunados con el fago P35 recombinante a las 0, 2 y 5 semanas postvacunación, por medio de la extracción fenólica con *TriPure Isolation Reagent*® (Roche®) descrita anteriormente por Chomczynski.⁷⁶ Brevemente, por cada muestra se utilizaron 1.2 ml de sangre. Para ello, se tomaron 400 µl de sangre con EDTA en 1 ml de TriPure®, se homogenizó perfectamente y posteriormente se adicionó 5 µl de DEPC (Dietilpirocarbonato. Inhibidor de RNAsas, USB®) y se mezcló en el vórtex durante 30 seg. Las muestras fueron conservadas en congelación a -70°C hasta su uso.

Posteriormente, se incubó a 30°C por 6 min, homogenizando en el vórtex por 30 seg cada 2 min de incubación. Después, las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido (-196°C) por 2 min y posteriormente, se descongelaron a temperatura ambiente y se volvieron a homogenizar. Este procedimiento se repitió tres veces consecutivas. A continuación, se agregaron 100 µl de cloroformo (Mallinckodt SpecttAR®), se homogenizaron en el vórtex por 45 seg y se incubó durante 5 min a 30°C. Nuevamente, las muestras se mezclaron en el vórtex por 5 seg cada minuto de incubación. Posteriormente, se centrifugaron 11,000 g por 15 min, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se les colocó 400 µl de isopropanol (Merck KGaA®) para llevar a cabo la precipitación del ARN. Las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min; a continuación, fueron centrifugadas a 11, 000 g por 10 min. Después, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 750 µl de etanol al 75% (Merck KGaA®) diluido con DEPC al 0.1% a cada muestra y posteriormente, se centrifugó a 11,000 g por 10 min a 4°C. Se decantaron las muestras y se dejaron secar las pastillas aproximadamente 10 min. Por último, las extracciones obtenidas en cada tubo, pertenecientes a una misma muestra de sangre se suspendieron en un volumen

final de 15 µl de agua con DEPC al 0.1 %, hidratando por 5 min y después homogenizando varias veces.

Para poder transportar las muestras, a cada una de ellas se les adicionó 50 µl de agua con DEPC al 0.1 %. Posteriormente, se agregaron 5 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se mezclaron perfectamente en el vórtex. A continuación, se añadieron 138 µl de etanol absoluto frío y se mezcló cuidadosamente por inversión. Las muestras se dejaron precipitando durante toda la noche a -70°C y posteriormente, se centrifugaron a 13,000 *g* por 15 min.⁷⁶

El procesamiento de las extracciones de ARN se llevó a cabo en la unidad de microarreglos de DNA en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En primer lugar, el ARN total extraído de la sangre de los tres ovinos a la semana 0 postvacunación fue combinado en un grupo con el fin de reducir los efectos de las respuestas individuales por animal en los resultados;⁷⁷ el mismo procedimiento se hizo para la semana 2 y 5 postvacunación. Se utilizaron proporciones equivalentes de ARN por individuo. Cada uno de los grupos generados fueron visualizados en geles de agarosa para verificar su calidad y cantidad.

Transcripción inversa. Se realizó la transcripción reversa de cada una de las mezclas de ARN obtenidas para generar el ADN complementario (ADNc) incorporando de manera simultánea Aminoallyl-dUTP al ADNc. Se hicieron dos mezclas de reactivos por separado para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa (**Cuadro 2 y 3**). Primero, se preparó la mezcla A (**Cuadro 2**) y después de homogenizar varias veces con una micropipeta la misma, la reacción se incubó por 10 min a 70°C. Posteriormente, se colocaron en hielo durante 10 min más y por último se centrifugaron a 13 000 *g* durante 30 seg.

Cuadro 2. Mezcla A de reactivos para la Transcripción Reversa.

Mezcla A

Reactivo	Laboratorio	Concentración inicial	µl
ARN		3 µg	8.0-12.0
Oligo(dT)	IFC	1 µg / µl	1
Hexámeros al azar	IFC	3 µg / µl	1
Agua con DEPC			C.b.p. 19 µl

Por otro lado, se preparó también la mezcla B de reactivos para la transcripción reversa (**Cuadro 3**), y se incorporó perfectamente con la primera mezcla; se centrifugó a 13 000 g durante 30 seg y posteriormente, se incubó 10 min a 25°C. Finalmente, se dejó incubando toda la noche a 42°C.

Cuadro 3. Mezcla B de reactivos para la Transcripción Reversa.

Mezcla B

Reactivo	Laboratorio	Concentración inicial	µl
Amortiguador de Reacción RT 5x (SuperScript II)	Invitrogen®	5 x	8
MgCl ₂	Promega®	25 mM	2
Aminoallyl-dNTP mix	Thermo Scientific®	dATP 5.0 mM dCTP 5.0 mM dGTP 5.0 mM dTTP 1.5 mM AA-dUTP 3.0 mM	4
DTT	Promega®	0.1 M	4
Transcriptasa reversa	Invitrogen®	200 U	3
Agua con DEPC			C.b.p. 21 µl

Posteriormente, se llevó a cabo la hidrólisis del ARN. Para ello, se añadió al ADNc 5 µl de NaOH 1N y 1 µl de EDTA 0.5 M; se incubó a 65°C durante 10 min y por último se agregó 25 µl de HEPES 1 M, pH 7.5 para neutralizar la reacción. Para realizar la purificación del ADNc Aminoallyl (aaADNc), se agregaron 7 µl de

acetato de sodio 3 M y 400 μ l de *Buffer PB* (Qiagen®). Posteriormente, se mezclaron los reactivos con la micropipeta y se colocaron en la columna *QIAquick PCR Purification Kit* de Qiagen®; se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y después se centrifugó a 14 000 *g* durante 1 min. Luego se lavó tres veces con 500 μ l de etanol al 80% y nuevamente, se centrifugó a 14000 *g* durante 1 min entre cada lavado. A continuación, se repitió este paso con los tubos vacíos para remover el exceso de etanol. En un tubo nuevo, se recuperó de la columna al aaADNc dos veces con 30 μ l de agua con DEPC al 0.1 %; se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugó a 14 000 *g* durante 1 min. La pastilla se secó por vacío en un equipo concentrador de vacío (*Integrated Speed Vac® System ISS110*, Savant®) y se suspendió en 4.5 μ l de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9.0).

Marcaje y purificación del ADNc. Para llevar a cabo la reacción de conjugación de los fluoróforos Alexa₅₅₅ y Alexa₆₄₇ (Invitrogen®), estos se disolvieron en 4.5 μ l de Dimetil sulfóxido (DMSO), se mezclaron con el vórtex y se agregaron al aaADNc purificado; se homogenizaron perfectamente. Posteriormente, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante al menos una hora. Para purificar el aaADNc marcado, en primer lugar se agregaron 71 μ l de agua con DEPC al 0.1 %. Posteriormente, se colocaron 8 μ l de acetato de sodio 3 M y 400 μ l de *Buffer PB*. Después, se mezclaron los reactivos con la micropipeta y se colocaron en la columna *QIAquick PCR Purification Kit* de Qiagen®; se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y después se centrifugó a 14 000 *g* durante 1 min. Luego se lavó tres veces con 500 μ l de etanol al 80% y nuevamente, se centrifugó a 14000 *g* durante 1 min entre cada lavado. A continuación, se repitió este paso con los tubos vacíos para remover el exceso de etanol. En un tubo nuevo, se recuperó de la columna al aaADNc marcado con 30 μ l de agua con DEPC al 0.1 % dos veces; se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugó a 14 000 *g* durante 1 min. Las muestras fueron cuantificadas por medio

de espectrofotometría (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific®) y almacenadas a -70°C hasta su uso.

Hibridación de los Microarreglos de ADN. Para llevar a cabo la hibridación se utilizaron tres microarreglos heterólogos de ADN de *Mus musculus* proporcionados por la unidad de microarreglos de DNA, IFC- UNAM (**Cuadro 4**). Para obtener el listado completo de los genes que se encuentran en el microarreglo, se puede visitar la página principal de la Unidad de Microarreglos de DNA del IFC (<http://microarrays.ifc.unam.mx/principal.html>). En este listado se indica tanto el número de identificación como la localización dentro de la laminilla.

Cuadro 4. Características de los microarreglos de expresión utilizados. Los oligos fueron fabricados por la compañía Sigma-Genosys®.

Número de genes	22 000 (77% del genoma)
Fuente de información	MGI/GenBank
Tamaño de las sondas	65 mer
Número de aplicaciones por gen	1
Número total de aplicaciones	23 232

Para los experimentos realizados, se evaluó el cambio en la expresión génica de los animales diagnosticados como positivos vacunados con el fago P35 recombinante durante la segunda semana postvacunación (Experimento A: Microarreglo M22K_09_08); durante la quinta semana postvacunación (Experimento B: Microarreglo M22K_09_010) y por último la diferencia en la expresión génica entre la segunda semana y la quinta semana postvacunación (Experimento C: Microarreglo M22K_09_11) [**Cuadro 5**].

Previamente a la hibridación, se realizó un tratamiento de las laminillas para conseguir una mayor homogeneidad de los puntos de impresión. Éstas se hidrataron exponiendo el lado impreso del microarreglo durante 10 seg al vapor de agua a 50°C durante 10 seg por tres ocasiones. Posteriormente, se fijó el ADN de las laminillas con dos ciclos de luz UV (0.12 J/ cm²) en el entrecruzador de ADN

(spectrolinker XI-1500, UV cross linker®); después, se incubaron las laminillas a 42°C durante 1 h en la solución de prehibridación (SSC 5x, SDS 0.1%, BSA 1%, EDTA 10 mM) con agitación suave (300 rpm).

Cuadro 5. Comparaciones que se realizarán en los ensayos de microarreglos: Animales diagnosticados como positivos vacunados con el fago P35 recombinante en el tiempo 0 (T_0) vs la segunda semana postvacunación (2s) [Experimento A], tiempo 0 (T_0) vs la quinta semana postvacunación (5s) [Experimento B] y segunda semana (2s) vs la quinta semana postvacunación (5s) [Experimento C].

Experimento	Microarreglo	Muestra- Alexa ₅₅₅	Muestra- Alexa ₆₄₇
A	M22K_09_08	T_0	2s
B	M22K_09_10	T_0	5s
C	M22K_09_11	2s	5s

A continuación, cada una de las laminillas fueron sumergidas en una solución con SDS 0.1%-SSC 2x (0.5 ml SDS 10%, c.b.p. 50 ml de agua destilada estéril; 5 ml SSC 20X (Citrato de sodio 0.3 M, NaCl 3.0 M), c.b.p. 50 ml de agua destilada estéril) durante 3 min a temperatura ambiente y agitación suave (300 rpm). Después, las plataformas fueron lavadas con SSC 2x (5 ml SSC 20X, c.b.p. 50 ml de agua destilada estéril) durante tres minutos; en seguida, se colocaron en agua hirviendo durante 2 min y a continuación, en etanol al 95% durante 2 min. Finalmente, se centrifugaron a 1500 g durante 5 min para secar las laminillas.

Una vez hecho el pretratamiento, se tomaron 25 pmol de cada uno de los aaADNc marcados y se mezclaron, se adicionó la solución de hibridación (SSC 5x, SDS 0.1%) y se ajustó el volumen con TE (**Cuadro 6**). Se homogenizó perfectamente y después se desnaturalizó a 94°C por 5 min y 30 seg a 65°C. La mezcla se colocó al microarreglo cubriendo la superficie con un cubreobjetos; a continuación, se colocó en la cámara de hibridación (Corning ®). Se incubó por 18 horas a 42°C sumergido en un baño de agua. Posteriormente, se lavaron las laminillas en agitación constante en una solución de SSC 2X-SDS al 0.1% a 42°C. Luego, se realizó otro lavado en una solución de SSC1X (2.5 ml SSC 20X, c.b.p. 50 ml de agua destilada estéril) a temperatura ambiente durante 5 min. Por último, se hizo

un lavado más con SSC 0.05X (0.125 ml SSC 20X, c.b.p. 50 ml de agua destilada estéril) a temperatura ambiente durante 5 min más. Finalmente, la laminilla se secó por centrifugación a 1500 g por 5 min.³⁵

Cuadro 6. Mezcla de reactivos para la hibridación.

Experimento	A	B	C
Comparación	T ₀ → 2s	T ₀ → 5s	2s → 5s
Microarreglo	M22K_09_08	M22K_09_10	M22K_09_11
Alexa₅₅₅ (25 pmol)	6 µl	6 µl	11 µl
Alexa₆₄₇ (25 pmol)	12 µl	7 µl	7 µl
SSC 20x	17.5 µl	17.5 µl	17.5 µl
SDS 1%	7 µl	7 µl	7 µl
TE	27.5 µl	32.5 µl	27.5 µl
Vol. Total	70 µl	70 µl	70 µl

Lectura y cuantificación de fluorescencia. Los microarreglos procesados fueron leídos con un lector para microarreglos (*GenPix Molecular Devices®*) y las imágenes obtenidas se cuantificaron con el software *Array Pro Analyzer®* (*Media Cybernetics®*) esto con el fin de obtener valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo.

Análisis de la expresión de genes. Para la identificación de los genes alterados en su expresión se utilizó el software *GenArise®* (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). *GenArise®* es una herramienta bioinformática para el análisis de los datos de microarreglos de doble color. El objetivo es identificar a aquellos genes que se expresan de manera diferencial. En primer lugar, el programa normaliza y corrige los resultados a través de una serie de transformaciones como la corrección del ruido de fondo y el filtro de intensidad. Una vez normalizados los datos, se identifican aquellos genes que de manera significativa modificaron su expresión a través de una medida estadística de la expresión conocida como *z-score*. Ésta nos indica a cuántas desviaciones

estándar se encuentra cada valor de nuestro conjunto de datos con respecto a la media y está expresada por la siguiente fórmula:⁷⁸

$$z_i = \frac{R_i - \text{media (R)}}{ds (R)}$$

donde:

z_i = Número de desviaciones estándar por valor con respecto a la media (*z-score*)

R_i = Logaritmo de la relación del valor de intensidad de señal obtenido con Alexa₅₅₅ entre el valor de Alexa₆₄₇.

$ds (R)$ = Desviación estándar del logaritmo de la relación del valor de intensidad de señal obtenido con Alexa₅₅₅ entre el valor de Alexa₆₄₇.

Posteriormente, los conjuntos de genes sobre o bajo expresados fueron clasificados en la base de datos *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* disponible en la página <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>.

16.0 Resultados

Cinética de la producción del fago P35 recombinante. A partir de la metodología descrita anteriormente, se llevó a cabo la producción del fago P35 recombinante para utilizarlo como antígeno en el ELISA P35 y la vacuna. Previamente, para comprobar la presencia del gen que codifica para la proteína P35 en las clonas utilizadas para la producción del antígeno vacunal, se realizó una PCR que genera un producto de 1218 pb, el cual corresponde al amplicón del vector pG8SAET más el gen *p35* (**Figura 9 A**) y otra PCR que genera un producto de 964 pb que corresponde al gen *p35* (**Figura 9 B**).⁷³ Los productos amplificados por la clona 5 fueron los que se visualizaron mejor en la electroforesis, por tanto, se decidió utilizar esta clona para la producción del antígeno en el biofermentador Microgen Fermentor/New Brunswick Scientific Co. Inc.®.

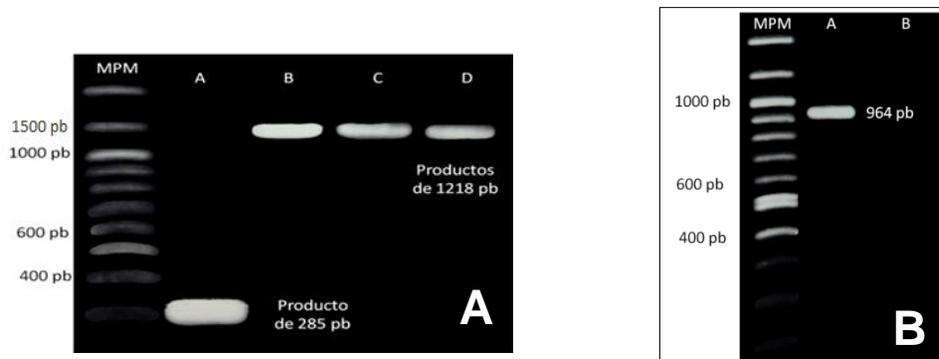


Figura 9. Fotografía de un gel de agarosa al 0.8% en TAE, teñido con bromuro de etidio donde se muestran el producto de PCR para el vector de expresión pG8SAET y para el gen *p35*. A) PCR pG8SAET. MPM: marcador de peso molecular de 100 pb; carril A: producto de 285 pb que corresponde al vector sin inserto (C-); carriles B al D: fragmentos de 1218 pb correspondientes al producto generado por la PCR del vector pG8SAET con el gen *p35* a partir del ADN de las clonas 1 a la 3. B) PCR P35. MPM: marcador de peso molecular 100 pb; carril A: fragmento de 964 pb correspondiente al producto generado por la PCR P35. Tomado de: Castellón AVE. Evaluación del fago recombinante P35 como vacuna en ovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Tesis de Doctorado inédita. México D.F.: FMVZ-UNAM, 2015.⁷³

Para conocer las condiciones adecuadas de producción del antígeno a gran escala, se realizó una cinética de crecimiento del fago P35 recombinante, monitoreando el cultivo en el biofermentador durante 16.5 h, este tiempo fue

determinado por la duración de la fase log, en el momento que se llegó a la fase estacionaria, la cinética se detuvo (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Cinética de crecimiento del fago P35 recombinante. Se midieron los valores de absorbancia a $\lambda=600$ nm, la concentración de proteína en $\mu\text{g/ml}$, el título de fago contando las unidades formadoras de colonia por ml (UFC), la temperatura en $^{\circ}\text{C}$, el % de oxígeno y el pH registrados en cada tiempo evaluado.

N° Muestra	Tiempo (h)	Absorbancia ($\lambda=600$ nm)	Concentración proteica ($\mu\text{g/ml}$)	Título (UFC/ml)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Oxígeno (%)	pH
1	0	0.038	0	3.32×10^6	-	-	-
2	1	0.039	0	6.63×10^6	-	-	-
3	2	0.047	0	6.8×10^6	-	-	-
4	4	0.076	20.80	2×10^7	-	-	-
5	6	0.248	21.76	2×10^{10}	-	-	-
6	7	0.395	25.54	2.5×10^{10}	37	51.5	6.3
7	8	0.579	37.68	3.5×10^{10}	36.8	78.5	6.4
8	9	0.647	26.51	2.4×10^{10}	36.8	60.1	6.4
9	10	1.031	55.78	1.7×10^{10}	37	16.4	6.5
10	11	1.57	72.00	2.2×10^{10}	36.7	1.2	6.5
11	12	2.25	96.97	4.2×10^{10}	37	1.6	6.6
12	13	2.55	126.28	1.3×10^{10}	36.8	1.5	6.9
13	14	2.89	140.77	0.2×10^{10}	36.9	1.4	7
14	15	3.16	154.88	1.1×10^{10}	36.7	1.3	7.2
15	16	2.99	162.26	-	36.8	0.8	7.3
16	16.5	3.12	170.16	3×10^{10}	37.2	0.7	7.4

En las **figuras 10, 11 y 12** se muestran las gráficas de absorbancia, concentración de proteína y los títulos de fago obtenidos en la cinética, respectivamente; en ambos casos se puede apreciar el comportamiento de una curva sigmoidea. Al finalizar la cinética, en el último tiempo evaluado, se obtuvo un título de 3×10^{10} fagos/ml y una concentración de proteínas de $170.16 \mu\text{g/ml}$. El comportamiento de los valores de densidad óptica y de concentración de proteína son similares (**figura 10 y 11**). El título más alto se obtuvo a las 12 h, justo a la mitad de la fase log. Posteriormente, disminuyó y a las 16.5 h de la cinética aumentó nuevamente, pero no se alcanzó el valor del título más alto obtenido a las 12 h.



Figura 10. Valores de absorbancia a $\lambda=600$ nm obtenidas en los diferentes tiempos evaluados durante la cinética de 16.5 h.



Figura 11. Concentración de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) obtenidas en los diferentes tiempos evaluados durante la cinética de 16.5 h.



Figura 12. Título del fago en \log_{10} (UFC/ml) obtenidos en los diferentes tiempos evaluados durante la cinética de 16.5 h.

De acuerdo a los principios de producción de vacunas veterinarias de la OIE, los antígenos vacunales generados en este estudio están clasificados dentro de la categoría II. Dentro de esta clasificación se establece que las modificaciones genéticas realizadas mediante la biotecnología no deben repercutir en un aumento de la virulencia, patogenicidad o supervivencia del microorganismo alterado en comparación con la forma de tipo silvestre y también indica que no se debe producir deterioro de las características de inocuidad del microorganismo.⁷⁹ Debido a que el cultivo obtenido aún conservaba bacterias *E. coli* viables y resistentes a los antibióticos utilizados, se esterilizó por medio de calor húmedo (autoclave) una vez terminada la cinética. Posteriormente, se determinó el título y la concentración de proteína después de la esterilización (**Cuadro 8**). Se observó una marcada disminución en el título de fago y la cantidad de proteína. Los títulos obtenidos después de la esterilización no fueron suficientes para inmunizar a los borregos debido a que para inocular a los animales con el título determinado (4×10^{13} fagos) se sobrepasa el volumen máximo de inyección por vía subcutánea (3ml).⁸⁰ Por este motivo, se decidió precipitar el cultivo con PEG al 20 % para poder concentrar un mayor título en un menor volumen (450 ml); se obtuvo un título de 2.4×10^{13} UFC/ml y una concentración proteica de 86 $\mu\text{g/ml}$ (**Cuadro 8**). Cabe mencionar que al llevar a cabo este último procedimiento, se cumplió el objetivo, pero aumentaron los costos de producción. Es necesario hacer más repeticiones de la curva de crecimiento para poder establecer el comportamiento de la misma y así optimizar los criterios de producción del fago.

Cuadro 8. Concentración de proteínas en $\mu\text{g/ml}$ y título de fago contando las unidades formadoras de colonia por ml (UFC) a partir de muestras colectadas en el último tiempo de la cinética (16.5 h) después de ser esterilizada en autoclave y después de ser precipitada con PEG al 20%.

Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g/ml}$)	Título (UFC/ml)
Esterilizada	16	2.2×10^{10}
Precipitada	86	2.4×10^{13}

Con los resultados obtenidos, la vacunación de los animales con el fago P35 recombinante se realizó una concentración de 0.2 mg/ 2 ml TBS.

PCR IS900 en las semanas 0, 2, 3 y 5 postvacunación de los animales vacunados con el fago P35 recombinante diagnosticados previamente como positivos a paratuberculosis. Todos los animales inmunizados con P35 fueron diagnosticados como negativos mediante esta prueba.

Tinción de Zielh-Neelsen en las semanas 0, 2, 3 y 5 postvacunación de los animales vacunados con el fago P35 recombinante diagnosticados previamente como positivos a paratuberculosis. Todos los animales inmunizados con P35 fueron diagnosticados como negativos mediante esta prueba.

ELISA P35 en las semanas 0, 2, 3 y 5 postvacunación de los animales vacunados con el fago P35 recombinante diagnosticados previamente como positivos a paratuberculosis. Todos los animales naturalmente infectados con *M. paratuberculosis* inmunizados con P35 fueron diagnosticados como positivos a paratuberculosis por ELISA P35.

Condición corporal (CC) durante las semanas 0, 2, 3 y 5 postvacunación de los animales vacunados con el fago P35 recombinante diagnosticados previamente como positivos a paratuberculosis. La mayoría de los animales inmunizados con P35 conservaron una condición corporal entre 2 y 2.5 durante todos los muestreos realizados. Donde según la escala, en los animales con CC2 las vértebras en sus porciones espinosas y transversas se tocan con facilidad, además tienen poca cantidad de músculo y grasa. Por otra parte, en los animales con CC3 la cantidad de músculo y grasa que hay entre las apófisis espinosa y transversa es moderada; las vértebras ya no se sienten tan fácilmente y se requiere de una ligera presión en la zona para poder palparlas.⁷⁵ La condición corporal 2.5 se encuentra entre estas dos últimas descripciones.

Se observó una ligera disminución de la condición corporal en un animal a la tercera semana postvacunación a CC2, pero aumentó ligeramente su condición a las cinco semanas a CC2.5. Los dos animales restantes, disminuyen su condición a la semana 5 postvacunación a CC2. En la **figura 13** se muestra la condición corporal de los animales inmunizados con P35 en la semana 0, 2, 3 y 5 postvacunación.



Figura 13. Condición corporal en la semana 0, 2, 3 y 5 postvacunación de los animales infectados naturalmente con *M. paratuberculosis* inmunizados con el fago P35 recombinante. Animales con condición corporal de 2 (CC2) las vértebras en sus porciones espinosas y transversas se tocan con facilidad, además tienen poca cantidad de músculo y grasa. Animales con condición corporal de 3 (CC3) la cantidad de músculo y grasa que hay entre las apófisis espinosa y transversa es moderada, las vértebras no se sienten tan fácilmente y se requiere de una ligera presión en la zona para poder palparlas.⁷⁵ La condición corporal 2.5 se encuentra entre estas dos últimas descripciones.

Formación de nódulos en el sitio de inoculación durante las semanas 2, 3 y 5 postvacunación de los animales vacunados con el fago P35 recombinante diagnosticados previamente como positivos a paratuberculosis En todos los animales naturalmente infectados inmunizados con P35 no se visualizó ni palpó la formación de nódulos en el sitio de inoculación.

Extracción de ARN total a partir de sangre. Se realizó la extracción del ARN total a partir de la sangre de los ovinos naturalmente infectados con *M. paratuberculosis* inmunizados con el fago P35 recombinante de acuerdo a la

metodología anteriormente descrita. Posteriormente, fue visualizado en un gel de agarosa al 1.0% en TAE sometido a una electroforesis a 83 Volts por 45 min. Por último, fue teñido en bromuro de etidio al 0.001% por 10 min y digitalizado para su posterior análisis (**Figura 14**).

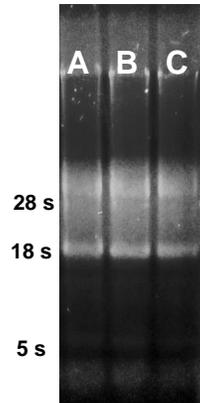


Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Del carril A al C se muestra la extracción del ARN total a partir de sangre de ovinos inmunizados con el fago P35 recombinante.

Con el ARN de los animales individuales se hicieron mezclas de grupos experimentales en los distintos tiempos (0, 2 y 5 semanas postvacunación) utilizando proporciones equivalentes de ARN por individuo con el fin de reducir los efectos de las respuestas individuales por animal en los resultados. Estas mezclas, fueron visualizados en geles de agarosa al 1.0% en TAE sometido a una electroforesis a 83 Volts por 45 min teñido en bromuro de etidio al 0.001% para verificar su integridad (**Figura 15**).

Análisis de la expresión de genes a través de la técnica de microarreglos. El análisis de expresión de los genes se llevó a cabo utilizando el software *GenArise*® para identificar aquellos genes que de manera significativa modificaron su expresión a través de una medida estadística de probabilidad de cambio en la expresión conocida como *z-score* (Z). Aquellos genes con un valor de Z mayor a 2 ó -2, se consideraron con un cambio estadísticamente significativo en su expresión. Los genes con valores de Z entre -1.5 y 1.5 se consideraron sin cambio

en su expresión, por otro lado, los mayores a 1.5 se consideran sobrexpresados y los menores a -1.5 se consideran subexpresados (**Figura 16**).

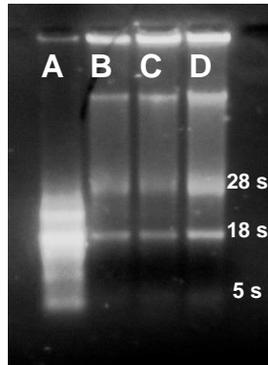


Figura 15. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. En el carril A se muestra la extracción del ARN total a partir de levadura como control positivo. En el carril B se observa el ARN total de la mezcla 1 (Semana 0). En el carril C se muestra el ARN total de la mezcla 2 (Semana 2) y en el carril D se observa el ARN total del mezcla 3 (Semana 5) provenientes de las muestras de sangre de ovinos infectados naturalmente con *M. paratuberculosis* e inmunizados con P35.

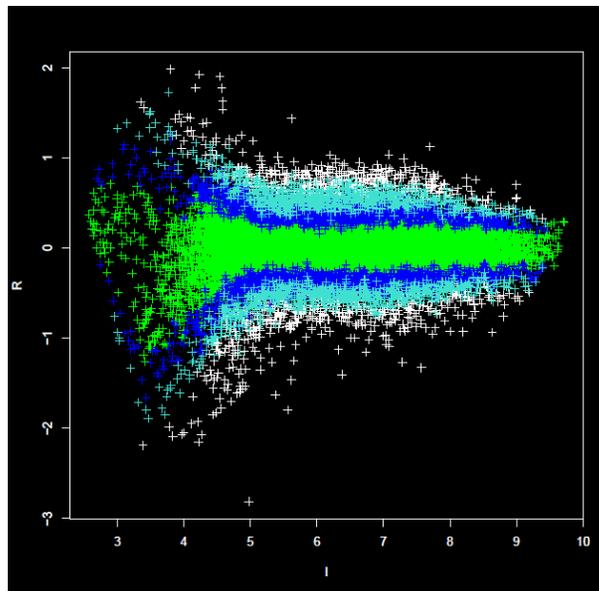


Figura 16. Expresión génica obtenida a partir de los datos ajustados y agrupados en categorías de acuerdo con su nivel de expresión. Los puntos verdes centrales agrupan a los genes con un *z-score* entre 1 y -1. Los puntos azul rey agrupan a los genes con un *z-score* entre 1 a 1.5 y -1 a -1.5 (genes sin cambio en la expresión). Los puntos en azul claro agrupan a los genes con un *z-score* entre 1.5 a 2 (genes sobrexpresados) y -1.5 a -2 (genes subexpresados) y por último, los puntos en blanco, agrupan a los genes con un *z-score* mayor a 2 (genes sobrexpresados) o menor a -2 (genes subexpresados).

De un total de 22 000 genes analizados en el experimento A, 2640 genes (12%) mostraron cambios en su expresión en los ovinos diagnosticados como positivos vacunados con la proteína P35 durante la segunda semana postvacunación. De estos, 1368 genes (6.2%) fueron sobrepresados y 1272 genes (5.8%) fueron subexpresados. Durante la quinta semana postvacunación, de los 22 000 genes analizados en el experimento B, 2490 genes (11.3%) mostraron cambios en su expresión: 1411 genes (6.4%) fueron sobrepresados y 1079 genes (4.9%) fueron subexpresados. Por último, al comparar la diferencia en la expresión de genes entre la segunda y la quinta semana postvacunación, de los 22 000 genes analizados en el experimento C, 2400 genes (10.9%) mostraron cambios en su expresión: 1698 genes (7.7%) fueron sobrepresados y 709 genes (3.2%) fueron subexpresados. El mayor porcentaje de cambio en la expresión de genes fue durante la segunda semana postvacunación. Asimismo, el menor porcentaje de cambio en la expresión de genes fue el que se mantuvo a lo largo de la segunda y quinta semana postvacunación. Cabe mencionar que el mayor porcentaje de genes sobrepresados fue el que se mantuvo a lo largo de la segunda y quinta semana postvacunación; mientras que para los genes subexpresados el mayor porcentaje se obtuvo durante la segunda semana postvacunación y el menor fue el que se mantuvo a lo largo de la segunda y quinta semana postvacunación **(Figura 17)**.

Una vez obtenidos los genes con una expresión génica diferencial, estos fueron clasificados de acuerdo a la base de datos *DAVID Bioinformatics Resources 6.7*. En este programa bioinformático, se utilizó la opción *Kegg Charts* donde muestra de una manera gráfica la distribución de los genes expresados de forma diferencial en las vías metabólicas reportadas en el *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).⁸¹ Con la información obtenida, se realizó una lista de todas las vías metabólicas modificadas, tanto las activadas como las suprimidas, los resultados se muestran en el **cuadro 9, 10 y 11**.

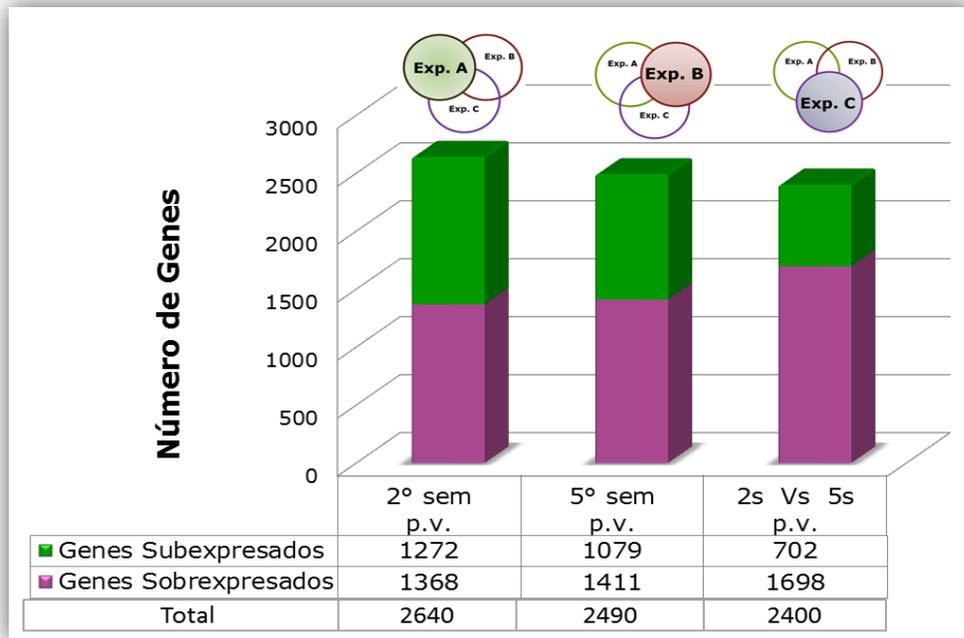


Figura 17. Número de genes con expresión diferencial en cada uno de los microarreglos utilizados. Experimento A: De un total de 22 000 genes analizados, 2640 genes (12%) mostraron cambios en su expresión en los ovinos diagnosticados como positivos vacunados con el fago P35 recombinante durante la segunda semana postvacunación: 1368 genes (6.2%) fueron sobrepresados y 1272 genes (5.8%) fueron subexpresados. Experimento B: De los 22 000 genes analizados, 2490 genes (11.3%) mostraron cambios en su expresión: 1411 genes (6.4%) fueron sobrepresados y 1079 genes (4.9%) fueron subexpresados durante la quinta semana postvacunación. Experimento C: De los 22 000 genes analizados en el experimento C, 2400 genes (10.9%) mostraron cambios en su expresión: 1698 genes (7.7%) fueron sobrepresados y 709 genes (3.2%) fueron subexpresados al comparar la diferencia en la expresión de genes entre la segunda y la quinta semana postvacunación.

Cuadro 9. Vías alteradas significativamente durante la segunda semana postvacunación en los ovinos diagnosticados como positivos vacunados con la proteína P35 (experimento A). En cursivas y negritas se muestran aquellas vías asociadas a la respuesta inmune del hospedador.

EXPERIMENTO A. Vías alteradas durante la segunda semana postvacunación	
Vía Activada	N° de genes involucrados
Vías en cáncer	25
<i>Regulación del citoesqueleto de actina</i>	22
<i>Vía de señalización MAPK</i>	22
<i>Interacción citocina-receptor de citocina</i>	21
<i>Adhesión</i>	18
<i>Vía de señalización Jak-STAT</i>	15
Vía de señalización Wnt	13
<i>Citotoxicidad mediada por células NK</i>	12
Vía de señalización PPAR	10
Enfermedad autoinmune de la tiroides	8
<i>Inmunodeficiencia primaria</i>	6
Vía Suprimida	N° de genes involucrados
Fosforilación oxidativa	12
Carcinoma de las células basales	7
Metabolismo del propionato	6
Degradación de la Valina, Leucina e Isoleucina	6
<i>Proteasoma</i>	6
Degradación de Lisina	5
Biosíntesis de hormonas esteroideas	4

Cuadro 10. Vías alteradas significativamente durante la quinta semana postvacunación en los ovinos diagnosticados como positivos vacunados con la proteína P35 (experimento B). En cursivas y negritas se muestran aquellas vías asociadas a la respuesta inmune del hospedador.

EXPERIMENTO B. Vías alteradas durante la quinta semana postvacunación	
Vía Activada	N° de genes involucrados
Vías en el Cáncer	22
<i>Vía de señalización de MAPK</i>	18
<i>Endocitosis</i>	17
Vía de señalización del calcio	16
Enfermedad de Alzheimer	14
<i>Vía de señalización de los receptores de células T</i>	13
Vía de señalización de la insulina	13
Vía de señalización de neurotrofina	12
<i>Vía de señalización de Fc epsilon RI</i>	9
Vía de señalización de GnRH	9
Melanogénesis	9
Cáncer pancreático	8
Vía de señalización VEGF	8
Diabetes mellitus Tipo II	7
Leucemia mieloide aguda	7
Metabolismo de la sacarosa y el almidón	5
Biosíntesis de ácidos grasos	3
Vía Suprimida	N° de genes involucrados
<i>Interacción citocina-receptor de citocina</i>	16
Metabolismo del Retinol	11
Metabolismo de fármacos	10
Biosíntesis de hormonas esteroideas	9
Metabolismos de xenobióticos por citocromo P450	9
Metabolismos del ácido araquidónico	7
<i>Linaje de células hematopoyéticas</i>	7
Metabolismo de ácido linoleico	6
Metabolismo de fármacos	6
Metabolismo de tirosina	5

Cuadro 11. Vías alteradas significativamente durante la semana 2 y 5 postvacunación en los ovinos diagnosticados como positivos vacunados con la proteína P35 (experimento C). En cursivas y negritas se muestran aquellas vías asociadas a la respuesta inmune del hospedador.

EXPERIMENTO C. Vías alteradas durante la semana 2 y la semana 5 postvacunación	
Vía Activada	N° de genes involucrados
Vías en el Cáncer	24
<i>Endocitosis</i>	22
Vía de señalización de la insulina	12
Vía de señalización del Calcio	12
<i>Vía de señalización de los receptores de células T</i>	7
Vía de señalización de neurotrofina	7
Vía de señalización de GnRH	7
<i>Vía de señalización de Fc epsilon RI</i>	7
Melanogénesis	7
Vía de señalización Hedgehog	7
Leucemia mieloide aguda	6
Vía de señalización VEGF	6
Carcinoma de células basales	6
Diabetes mellitus tipo II	5
Cáncer pancreático	5
Potenciación a largo plazo	4
Vía Suprimida	N° de genes involucrados
Enfermedad de Alzheimer	9
Fosforilación oxidativa	8

De las 45 vías alteradas significativamente obtenidas por el programa *DAVID Bioinformatics Resources 6.7*, la vía en el cáncer fue la única que se mantuvo activada desde la semana 0 hasta la semana 5 postvacunación. Asimismo, 13 vías se mantuvieron activas a lo largo de los diferentes tiempos evaluados (segunda y quinta semana postvacunación) [Vía de señalización de los receptores de células T, endocitosis, vía de señalización de Fc epsilon RI, vía de señalización de neurotrofina, vía de señalización de MAPK, cáncer pancreático, melanogénesis, vía de señalización del GnRH, leucemia mieloide aguda, vía de señalización VEGF, diabetes mellitus tipo II, vía de señalización de la insulina y la vía de

señalización del calcio]. Por otro lado, la vía de la fosforilación oxidativa fue suprimida a lo largo de los diferentes tiempos evaluados (segunda y quinta semana postvacunación). La interacción citocina-receptor de citocina fue activada a la segunda semana postvacunación, pero después fue suprimida a la quinta semana. La vía del carcinoma de células basales fue suprimida a las dos semanas postvacunación y posteriormente, se activó a la quinta semana. Por último, la enfermedad de Alzheimer fue activada a las 5 semanas postvacunación, pero comparada con la segunda semana postvacunación, la vía fue suprimida. De manera simultánea, a través del programa *DAVID Bioinformatics Resources 6.7*, se obtuvieron los genes con expresión diferencial de cada una de las vías alteradas en cada uno de los experimentos de microarreglos (**Anexo A**). Posteriormente, se seleccionaron aquellas vías y genes asociados a la respuesta inmune del hospedador (**Cuadro 12**); en la **figura 18** se esquematizan estos genes.

Cuadro 12. Vías modificadas y genes que tuvieron expresión diferencial, asociados a la respuesta inmune del hospedador. Experimento A: Vías modificadas y genes que tuvieron expresión diferencial durante la segunda semana postvacunación en animales diagnosticados como positivos vacunados con el fago P35 recombinante. Experimento B: Vías modificadas y genes que tuvieron expresión diferencial durante la quinta semana postvacunación en animales diagnosticados como positivos vacunados con el fago P35 recombinante. Experimento C: Vías modificadas y genes que tuvieron expresión diferencial durante la segunda y quinta semana postvacunación en animales diagnosticados como positivos vacunados con el fago P35 recombinante.

Vía alterada	Genes sobreexpresados	Genes subexpresados
Regulación del citoesqueleto de actina	<p>Experimento A:</p> <p><i>Itga2</i>: <u>integrin alpha 2</u></p> <p><i>Itgb1</i>: <u>integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</u></p> <p><i>Itgb4</i>: <u>integrin beta 4</u></p> <p><i>Pik3cb</i>: <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u></p>	

<p style="text-align: center;">Interacción citocina-receptor de citocina</p>	<p>Experimento A: <i>Cd40lg</i>: <u>CD40 ligand</u> <i>Ccr9</i>: <u>chemokine (C-C motif) receptor 9</u> <i>Ifna11</i>, <i>LOC100044216</i>: <u>interferon alpha 11; hypothetical protein LOC100044216</u> <i>Ifna2</i>: <u>interferon alpha 2</u> <i>Ifng</i>: <u>interferon gamma</u> <i>Il1b</i>: <u>interleukin 1 beta</u> <i>Il2ra</i>: <u>interleukin 2 receptor, alpha chain</u> <i>Il4</i>: <u>interleukin 4</u> <i>Il9</i>: <u>interleukin 9</u> <i>Ccl21b</i>, <i>Ccl21c</i>, <i>Gm10591</i>, <i>Gm13304</i>, <i>LOC100041504</i>, <i>LOC100041593</i>: <u>predicted gene 13304; similar to beta chemokine Exodus-2; predicted gene 10591; chemokine (C-C motif) ligand 21B; chemokine (C-C motif) ligand 21C (leucine)</u> <i>Gm614</i>, <i>Il2rg</i>: <u>predicted gene 614; interleukin 2 receptor, gamma chain</u> <i>Tnfsf4</i>: <u>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4</u> <i>Tnfrsf13c</i>: <u>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c</u></p>	<p>Experimento B: <i>Ccl28</i>: <u>chemokine (C-C motif) ligand 28</u> <i>Ccl9</i>: <u>chemokine (C-C motif) ligand 9</u> <i>Cxcl16</i>: <u>chemokine (C-X-C motif) ligand 16</u> <i>Csf2rb2</i>: <u>colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)</u> <i>Il22</i>, <i>Il2ifb</i>: <u>interleukin 10-related T cell-derived inducible factor beta; interleukin 22</u> <i>Gm13305</i>, <i>Gm2002</i>, <i>Il11ra2</i>: <u>interleukin 11 receptor, alpha chain 2; predicted gene 13305; predicted gene, 100038993</u> <i>Il3</i>: <u>interleukin 3</u> <i>Cxcl11</i>: <u>similar to Small inducible cytokine B11 precursor (CXCL11) (Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) (I-TAC); chemokine (C-X-C motif) ligand 11</u> <i>Tnfsf8</i>: <u>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8</u> <i>Tnfrsf9</i>: <u>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9</u></p>
<p style="text-align: center;">Vía de señalización Jak- STAT</p>	<p>Experimento A: <i>Jak2</i>: <u>Janus kinase 2</u> <i>Ifna11</i>, <i>LOC100044216</i>: <u>interferon alpha 11; hypothetical protein LOC100044216</u> <i>Ifna2</i>: <u>interferon alpha 2</u> <i>Ifng</i>: <u>interferon gamma</u> <i>Il2ra</i>: <u>interleukin 2 receptor, alpha chain</u> <i>Il4</i>: <u>interleukin 4</u> <i>Il9</i>: <u>interleukin 9</u> <i>Pik3cb</i>: <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u> <i>Gm614</i>, <i>Il2rg</i>: <u>predicted gene 614; interleukin 2 receptor, gamma chain</u> <i>Stat1</i>: <u>signal transducer and activator of transcription 1</u> <i>Stat6</i>: <u>signal transducer and activator of transcription 6</u> <i>Stam2</i>: <u>signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2</u> <i>LOC100045296</i>, <i>Stat3</i>: <u>similar to Stat3B; signal transducer and activator of transcription 3</u> <i>Socs3</i>: <u>suppressor of cytokine signaling 3</u></p>	

<p style="text-align: center;">Adhesión</p>	<p>Experimento A: Itga2: <u>integrin alpha 2</u> Itgb1: <u>integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</u> Gm6263, Ilk: <u>integrin linked kinase; predicted gene 6263</u> Pik3cb: <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u></p>	
<p style="text-align: center;">Vía de señalización MAPK</p>	<p>Experimento A: Traf2: <u>TNF receptor-associated factor 2</u> Atf2, LOC100047997: <u>activating transcription factor 2; similar to Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2 (Activating transcription factor 2) (cAMP response element-binding protein CRE-BP1) (MXBP protein)</u> Il1b: <u>interleukin 1 beta</u> Gm8188, Map3k7: <u>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7; predicted gene 8188</u> Map4k2: <u>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2</u> Prkcb: <u>protein kinase C, beta</u></p> <p>Experimento B: Atf4: <u>activating transcription factor 4</u> Cacnb4: <u>calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit</u> Ikbkg: <u>inhibitor of kappaB kinase gamma</u> Il1b: <u>interleukin 1 beta</u> Tab2: <u>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2</u> RelA: <u>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</u></p>	
<p style="text-align: center;">Inmunodeficiencia primaria</p>	<p>Experimento A: Cd4: <u>CD4 antigen</u> Cd40lg: <u>CD40 ligand</u> Ada: <u>adenosine deaminase</u> Gm614, Il2rg: <u>predicted gene 614; interleukin 2 receptor, gamma chain</u> Tnfrsf13c: <u>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c</u></p>	
<p style="text-align: center;">Citotoxicidad mediada por células NK</p>	<p>Experimento A: Ifna11, LOC100044216: <u>interferon alpha 11; hypothetical protein LOC100044216</u> Ifna2: <u>interferon alpha 2</u> Ifng: <u>interferon gamma</u> Klra7: <u>killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7</u></p>	

	<p>Ncr1: <u>natural cytotoxicity triggering receptor 1</u></p> <p>Pik3cb: <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u></p> <p>Prkcb: <u>protein kinase C, beta</u></p> <p>Gm4697, Klrb1c, LOC100048689: <u>similar to natural killer cell receptor-P1; predicted gene 4697; killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1C</u></p>	
Proteasoma		<p>Experimento A:</p> <p>Gm3375, Psmb5: <u>predicted gene 3375; proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5</u></p> <p>Psm14: <u>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14</u></p> <p>Psm3: <u>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3</u></p> <p>Psm2: <u>proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2</u></p> <p>Psm9: <u>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)</u></p> <p>Psm11: <u>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 11</u></p>
Vía de señalización de los receptores de células T	<p>Experimento B:</p> <p>Cd8b1: <u>CD8 antigen, beta chain 1</u></p> <p>Ctla4: <u>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; similar to cytotoxic T-lymphocyte associated molecule 4</u></p> <p>Ikbkg: <u>inhibitor of kappaB kinase gamma</u></p> <p>Ifng: <u>interferon gamma</u></p> <p>Il10: <u>interleukin 10</u></p> <p>Il4: <u>interleukin 4</u></p> <p>Nfat5: <u>nuclear factor of activated T-cells 5</u></p> <p>Lcp2: <u>lymphocyte cytosolic protein 2</u></p> <p>Pik3cd: <u>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene</u></p> <p>Pik3cb: <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u></p> <p>Experimento C:</p> <p>Ctla4: <u>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; similar to cytotoxic T-lymphocyte associated molecule 4</u></p> <p>Ikbkg: <u>inhibitor of kappaB kinase gamma</u></p> <p>Lcp2: <u>lymphocyte cytosolic protein 2</u></p> <p>Zap70: <u>zeta-chain (TCR) associated protein kinase</u></p>	

<p style="text-align: center;">Endocitosis</p>	<p>Experimento B:</p> <p>Rab4a: <u>RAB4A, member RAS oncogene family</u></p> <p>H2-q1, H2-q2, H2-q6, H2-q7, H2-q8, H2-q9, <u>LOC100044019, LOC100044020, LOC100044021, LOC100044307, LOC676708, LOC68395:</u> <u>histocompatibility 2, Q region locus 1; histocompatibility 2, Q region locus 9; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain precursor; histocompatibility 2, Q region locus 8; histocompatibility 2, Q region locus 2; similar to MHC class Ib antigen; histocompatibility 2, Q region locus 7; histocompatibility 2, Q region locus 6; hypothetical protein LOC100044307; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain precursor (QA-2 antigen); RIKEN cDNA 0610037M15 gene</u></p> <p>Tfrc: <u>transferrin receptor</u></p> <p>Zfyve20: <u>zinc finger, FYVE domain containing 20</u></p> <p>Experimento C:</p> <p>Rab4a: <u>RAB4A, member RAS oncogene family</u></p> <p>Rab5c: <u>RAB5C, member RAS oncogene family</u></p> <p>Traf6: <u>TNF receptor-associated factor 6</u></p> <p>Gm8712, Snf8: <u>predicted gene 8712; SNF8, ESCRT-II complex subunit, homolog (S. cerevisiae)</u></p> <p>H2-T24, LOC100045444: <u>similar to histocompatibility 2, T region locus 24; histocompatibility 2, T region locus 24</u></p> <p>Tfrc: <u>transferrin receptor</u></p>	
<p style="text-align: center;">Vía de señalización de Fc epsilon RI</p>	<p>Experimento B:</p> <p>Fcer1g: <u>Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide</u></p> <p>Il4: <u>interleukin 4</u></p> <p>Lcp2: <u>lymphocyte cytosolic protein 2</u></p> <p>Pik3cd: <u>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene</u></p> <p>Pik3cb: <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u></p> <p>Gm5353, Gm900, Igh, Igh-2, Igh-VJ558, Ighv1-31, <u>LOC100048770, LOC634100, LOC634206, LOC634338, LOC634541, LOC640701:</u> <u>predicted gene 5353;</u></p>	

	<p><u>immunoglobulin heavy chain (J558 family); similar to Ig heavy chain V region 108A precursor; similar to Ig heavy chain V-I region V35 precursor; predicted gene 900; immunoglobulin heavy chain complex; similar to Ig H-chain V-JH1-region; immunoglobulin heavy variable V1-31; immunoglobulin heavy chain 2 (serum IgA)</u></p> <p>Prkcd: <u>protein kinase C, delta</u></p> <p>Experimento C:</p> <p>Fcer1g: <u>Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide</u></p> <p>Lcp2: <u>lymphocyte cytosolic protein 2</u></p>	
<p>Linaje de células hematopoyéticas</p>		<p>Experimento B:</p> <p>Cd37: <u>CD37 antigen</u></p> <p>Cd5: <u>CD5 antigen</u></p> <p>Cd59a: <u>CD59a antigen</u></p> <p>Gm13305, Gm2002, Il11ra2: <u>interleukin 11 receptor, alpha chain 2; predicted gene 13305; predicted gene, 100038993</u></p> <p>Il3: <u>interleukin 3</u></p> <p>Tfrc: <u>transferrin receptor</u></p> <p>Itga2: <u>integrin alpha 2</u></p>

Durante la segunda semana postvacunación, genes asociados a las vías de señalización (*Il2ra*, *Il2rg*, *Jak2*, *Stat1*, *Stat6*, *Stat3*, *Traf2*, *Atf2*, *Map3k7*, *Map4k2*, *Stam2*, *Socs3*), adherencia (*Itgb1*, *Itgb4*, *Ilk*), a la respuesta inmune celular (*Ifna2*, *Ifna11*, *Tnfsf4*, *Il9*, *Ada*, *Cd4*, *Klra7*, *Ncr1*, *Klrb1c*), a la respuesta inmune humoral (*Prkcb*, *Tnfrsf13c*, *Cd40lg*) así como genes que codifican para quimiocinas y quimiorreceptores (*Ccr9*, *Ccl21b*) aumentaron su expresión y genes asociados al proteosoma (*Psmb5*, *Psmd14*, *Psmd3*, *Psm2*, *Psmb9*, *Psbm11*) disminuyeron su expresión (**Figura 18**).

Durante la quinta semana postvacunación, genes asociados a las vías de señalización (*Atf4*, *Cacnb4*, *Tab2*, *RelA*, *Nfat5*), a la respuesta inmune celular (*Cd8b1*, *H2-q1-9*, *Il10*), a la respuesta inmune humoral (*Igh-2*, *Prkcd*) así como genes asociados al tránsito intracelular (*Pik3cd*, *Zfyve20*) aumentaron su expresión. Por otro lado, genes asociados a la respuesta inmune celular (*Tnfsf8*, *Tnfrsf9*, *Csf2rb2*, *Il22*, *Il11ra2*, *Il3*, *Cd37*, *Cd5*), a la respuesta inmune humoral

(Cd59a), genes asociados al tránsito intracelular (*Tfrc*) así como genes que codifican para quimiocinas y quimiorreceptores (*Ccl28*, *Ccl9*, *Cxcl16*, *Cxcl11*) disminuyeron su expresión. Asimismo, durante la quinta semana comparada con la semana dos postvacunación, genes asociados a las vías de señalización (*Zap70*, *Traf6*), a la respuesta inmune celular (*H2-t24*), a la respuesta inmune humoral (*Igh-2*, *Prkcd*) así como genes asociados al tránsito intracelular (*Rab5c*, *Snf8*) aumentaron su expresión (**Figura 18**).

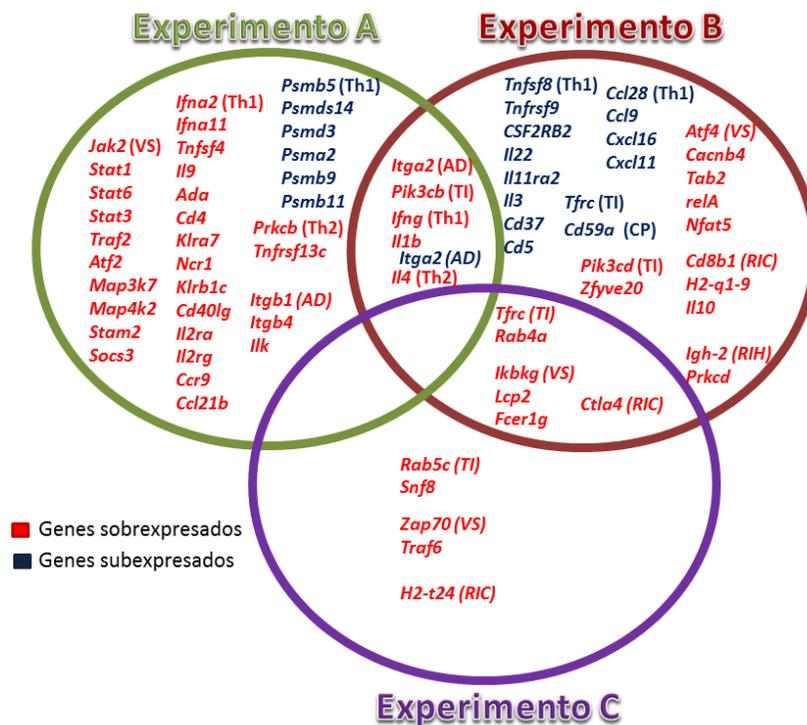


Figura 18. Genes con expresión diferencial asociados a la respuesta inmune del hospedador. Las intersecciones contienen a los genes que modificaron su expresión en los diferentes tiempos evaluados. En rojo se muestran los genes que fueron sobreexpresados y en azul los subexpresados. Experimento A: Genes con expresión diferencial en la segunda semana postvacunación en animales diagnosticados como positivos vacunados con el fago P35 recombinante. Experimento B: Genes con expresión diferencial en la quinta semana postvacunación en animales vacunados diagnosticados como positivos. Experimento C: Genes con expresión diferencial en la segunda y quinta semana postvacunación en animales vacunados diagnosticados como positivos. VS: Genes asociados a vías de señalización relacionados a la respuesta inmune. AD: Genes asociados a la adherencia. RIC: Genes asociados a la respuesta inmune celular. RIH: Genes asociados a la respuesta inmune humoral. QC: Genes que codifican para quimiocinas y quimiorreceptores. PS: Genes asociados al proteosoma. TI: Genes asociados al tránsito intracelular.

Los genes que aumentaron su expresión tanto en la segunda como en la quinta semana postvacunación fueron asociados a adherencia (*Itga2*), a la respuesta inmune celular (*Ifng*, *Il1b*), a la respuesta inmune humoral (*Il4*) así como genes asociados al tránsito intracelular (*Pik3cd*). Únicamente, un gen asociado a adherencia disminuyó su expresión (*Itga2*) en estos tiempos (**Figura 18**). Por otro lado, los genes que aumentaron su expresión durante la quinta semana postvacunación comparados con el tiempo cero y la segunda semana postvacunación fueron asociados a la respuesta inmune celular (*Ctla4*), a las vías de señalización (*Ikbkg*, *Icp2*, *Fcer1g*) así como genes asociados al tránsito intracelular (*Tfrc*, *Rab4a*). Por último, en la **figura 19** se muestra una representación visual de los genes expresados diferencialmente en la vía de señalización de los receptores de células T asociados a la activación de factores de transcripción para la expresión de citocinas proinflamatorias (INF γ) IL-3 e IL-22, así como citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 en las borregas naturalmente infectadas vacunadas con el fago P35 recombinante.

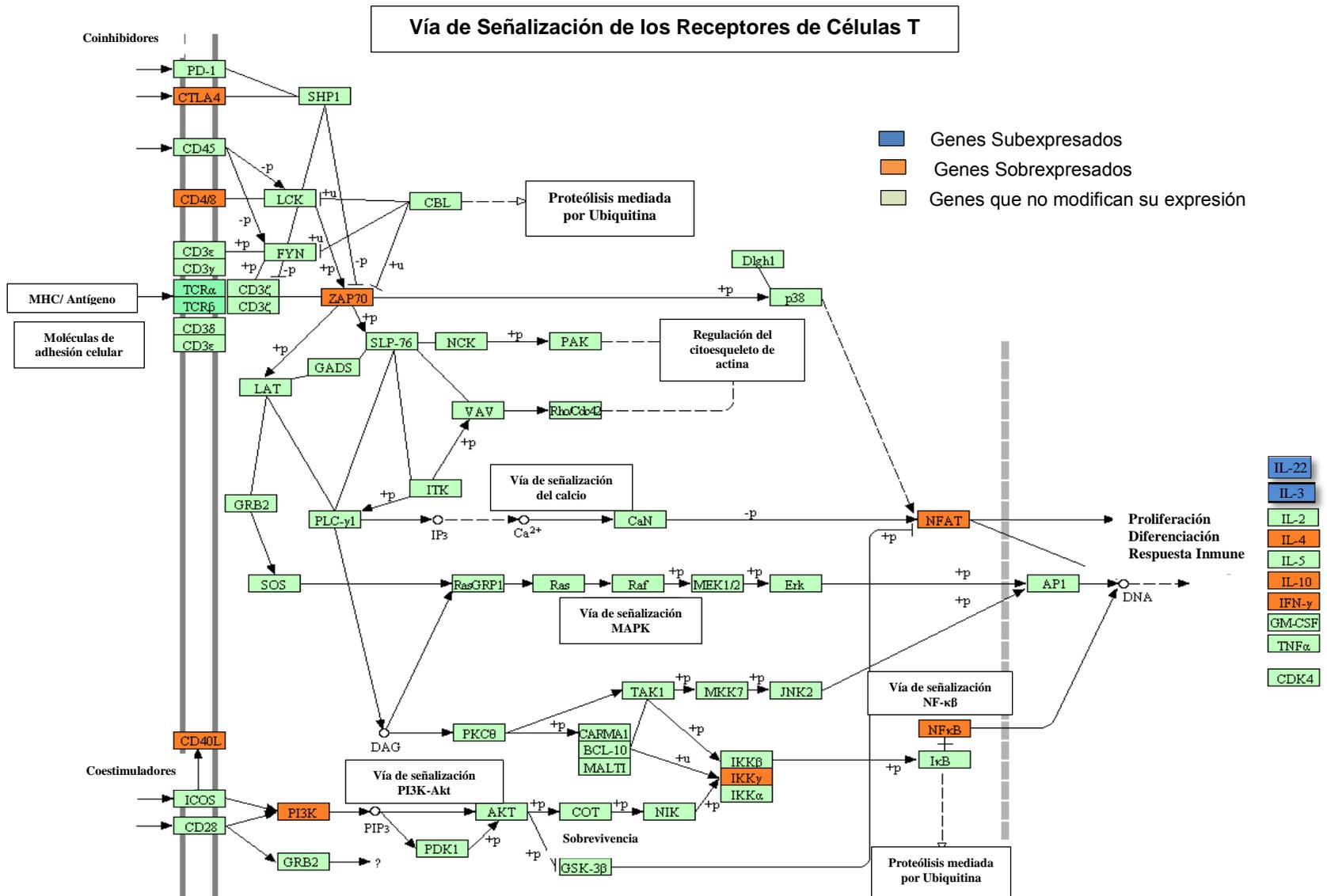


Figura 19. Representación visual de los genes con expresión diferencial de la vía de los receptores de células T asociados a la activación de factores de transcripción para la expresión de IFN γ , IL-3 e IL-22, así como citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 en las borregas naturalmente infectadas vacunadas con el fago P35 recombinante. En la imagen se observan los genes sobrexpresados en color naranja, los subexpresados en color azul y los que no modificaron su expresión en verde.

17.0 Discusión

En el presente trabajo se determinó de manera cualitativa la expresión diferencial de los genes relacionados con la respuesta inmune de los leucocitos de ovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vacunados con el fago P35 recombinante mediante el uso de microarreglos. Este estudio es único en su tipo debido a que no existen antecedentes de esta clase de análisis para llevar a cabo la evaluación del efecto vacunal contra la paratuberculosis en la respuesta inmune de los borregos, únicamente hay investigaciones hechas en infecciones experimentales en ovinos y bovinos donde reportan la capacidad de *M. paratuberculosis* para persistir dentro de los macrófagos del hospedador debido a una eficiente invasión y una evasión así como manipulación del sistema inmune y diversas vías metabólicas. En los resultados obtenidos se observó la modificación en la expresión de genes relacionados con la respuesta Th1, la cual favorece la resistencia contra patógenos intracelulares como *M. paratuberculosis*, a la segunda y quinta semana postvacunación; también hubo cambio en la expresión de genes relacionados con vías de señalización celular, el tránsito intracelular y adhesión celular así como algunos genes relacionados con la respuesta Th2. Entre el gran número de genes que modificaron su expresión, el estudio se sesgó a aquellos relacionados con la respuesta inmune de los animales vacunados para poder conocer la respuesta generada en el transcriptoma de los mismos después de la administración de la vacuna.^{38,40,41,82,83,84}

La tecnología de microarreglos permite identificar grupos de genes que están implicados en la activación o supresión de diversas vías, entre ellas, las relacionadas con el sistema inmune.⁸⁵ Por tanto, al hacer el análisis del transcriptoma de los animales vacunados de este trabajo, se identificó el efecto vacunal dentro de estas rutas. Existen antecedentes previos del uso de microarreglos para caracterizar la respuesta inmune después de la administración de una vacuna. Por ejemplo, en el 2006, Byon *et al.* evaluaron la respuesta

respuesta generada después de la inoculación de una vacuna recombinante en peces para identificar a los genes relacionados con la inmunidad protectora tanto celular como humoral.⁸⁶ Asimismo, se utilizó también para medir el estatus inmunológico de individuos con cáncer después de la vacunación;⁸⁰ sin embargo, en el caso de la evaluación del efecto vacunal contra la paratuberculosis en la respuesta inmune de ovinos no existen antecedentes de análisis de este tipo.^{38,40,41,82,83,84}

La mayoría de las vías metabólicas modificadas en este estudio, a excepción del metabolismo de los fármacos y el cáncer pancreático, fueron reportadas previamente en un estudio de Khare *et al* (2012) donde se analizó el transcriptoma de los bovinos infectados con *M. paratuberculosis* y se encontró cambios en la expresión génica que sugieren que la sobrevivencia y persistencia de la micobacteria en la mucosa del intestino está asociada a la inmuno tolerancia del hospedador desde etapas tempranas, es decir, cuando la micobacteria tiene contacto con las placas de Peyer. Cabe señalar que varios de los genes expresados de manera diferencial en la infección experimental asociados a la sobrevivencia y persistencia de la micobacteria, no fueron los mismos o la modificación en la expresión fue diferente a los encontrados en este trabajo, lo que nos puede sugerir que algunos mecanismos que *M. paratuberculosis* utiliza para generar inmunotolerancia son modificados después de la administración de la vacuna.⁴⁰

Dentro de las vías activadas se encuentran las relacionadas a la regulación del citoesqueleto de actina y adhesión. Estas vías sirven para facilitar el tránsito y migración de linfocitos T dentro de los sitios de inflamación, el movimiento de los linfocitos dentro de tejidos extravasculares y la interacción física entre los antígenos y los linfocitos T reactivos, así como las células presentadoras de antígeno que son necesarias para una eficiente activación de los linfocitos T.⁴⁰ En este trabajo se encontró que algunos genes relacionados con la adhesión celular (*Itgb1*, *Itgb4*, *Ilk*, *Itga2*) aumentaron su expresión principalmente en la segunda,

pero también en la quinta semana postvacunación a diferencia de las infecciones experimentales donde nueve genes relacionados a estas vías (*Itgb1*, *Ptk2*, *Map2k1*, *Sell*, *Mapk1*, *Mpz11*, *Cd99*, *Itga4* y *Cldn7*) disminuyen su expresión fuertemente durante la primera hora postinfección.⁴⁰ Por el contrario, en un estudio realizado por Rossi G *et al* (2009) se observó un aumento en la expresión de la integrina $\beta 1$, codificada por el gen *Itgb1*, en venas, vénulas y capilares de ovinos infectados naturalmente y con lesiones paucibacilares.⁸⁷ Smeed JA *et al* (2010) obtuvieron resultados similares.³⁸ El único gen relacionado con la adhesión que presenta una disminución en su expresión en la semana 2 y 5 postvacunación es *Itga2*, la cual puede actuar como receptora del complejo fibronectina y proteína de unión a la fibronectina de *M. paratuberculosis*. Por lo tanto, la disminución en la expresión de este gen jugaría un papel en la defensa del hospedador al evitar la formación de puentes de fibronectina para la entrada de la bacteria.^{29,40}

Asimismo, la vía de interacción citocina-receptor de citocina fue activada durante la segunda semana postvacunación, pero en la quinta semana fue suprimida. Esta vía incluye genes que codifican para quimiocinas, interleucinas, IFN y TNF. Las quimiocinas y sus receptores son importantes en el proceso de quimiotaxis para facilitar la migración de diversos tipos celulares dentro del sitio de inflamación. Dentro de los genes que codifican para los receptores de quimiocinas y quimiocinas que aumentaron su expresión en la segunda semana están *Ccr9* y *Ccl21b*, estos se asocian a la transducción de señales y quimiotaxis de linfocitos T respectivamente, lo que nos sugiere que en las primeras dos semanas postvacunación aumenta la cantidad de linfocitos T y que a su vez, estas células llevan a cabo una serie de señalizaciones que podrían permitir la activación de factores de transcripción para la expresión de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, hubo genes que disminuyeron su expresión durante la quinta semana postvacunación: *Ccl28*, *Ccl9*, *Cxcl16*, *Cxcl11*, estos se relacionan con la atracción de diversos tipos celulares en el sitio de inflamación.⁸⁸ En infecciones experimentales de *M. paratuberculosis* en bovinos hay sobreexpresión de *Ccr4*, *Cxcl9*, *Blr1* y *Ccr8* durante la primera hora postinfección, *Ccl24*, *Cx3cl1*, *Ccl8* y

Ccl20 de las 2 a las 12 h postinfección y *Cxcl11*, quimiotáctica para linfocitos T activados, fue subexpresado en estos tiempos. La expresión de este último gen coincide con los resultados de este trabajo lo que puede indicar un efecto similar entre animales vacunados e infectados.⁴⁰

Por otro lado, las interleucinas son un elemento clave de la respuesta inmune tanto celular como humoral, debido a que promueven el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos T, B y las células hematopoyéticas. En la vía de interacción citocina-receptor de citocina aumentaron su expresión los siguientes genes durante la segunda semana postvacunación: *Il1b*, *Il9*, *Il2rg*, *Il2ra*, *Il4*; las cuatro primeras están asociadas con la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B. Particularmente, *Il1b* se ha encontrado sobreexpresada en infecciones experimentales de *M. paratuberculosis* de las 2 a las 12 h postinfección a través de microarreglos en el íleon de los bovinos.⁴⁰ De manera similar se encontró un aumento en la expresión de *Il1b* en infecciones paucibacilares en ovinos naturalmente infectados a través de PCRq.⁸⁹ Esta presentación está relacionada con la respuesta Th1, se caracteriza por la presencia de gran cantidad de linfocitos, eosinófilos, citocinas como IFN γ e IL-12, por tanto, poca cantidad de micobacterias.^{85,90}

Por otra parte, IL4 es una citocina antiinflamatoria asociada a la respuesta Th2. Es capaz de bloquear la síntesis de IL-1, TNF α e IL-6; además, promueve la diferenciación de linfocitos Th2 así como la proliferación y diferenciación de linfocitos B.⁸⁶ Tanto *Il4* como *Il1b*, se mantuvieron sobreexpresados en la segunda y la quinta semana postvacunación. Otra citocina asociada a la respuesta Th2 que aumentó su expresión fue *Il10*, cabe mencionar que este cambio fue a partir de la quinta semana postvacunación. La sobreexpresión de *Il-10* e *Il4* nos puede sugerir un sinergismo entre estas citocinas, lo que puede llevar a una supresión de la respuesta Th1. Smeed *et al* (2007) observaron que tanto en formas paucibacilares como multibacilares de la paratuberculosis existe un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β y antiinflamatorias como IL-10, sólo

que el cambio en la expresión de las citocinas es diferente para cada presentación de la enfermedad.⁸⁷ Es probable que pueda estar pasando un evento similar en este estudio con la expresión simultánea de las citocinas de respuesta Th1 y Th2, pero con los resultados obtenidos, no se conoce con exactitud cuál es el nivel de cambio en la expresión de forma cualitativa para cada citocina.

Por otro lado, durante la quinta semana postvacunación, los genes *Il22*, *Il3*, *Csf2rb2* y *Il11ra2* disminuyen su expresión (**cuadro 17 y figura 17**). Estas citocinas y sus receptores se relacionan con la respuesta inflamatoria y la proliferación de células hematopoyéticas.⁸⁶ La activación de la vía del linaje de células hematopoyéticas, está relacionada con la respuesta que genera el sistema inmune del hospedador hacia la micobacteria. En infecciones experimentales de *M. paratuberculosis* en bovinos, a través de microarreglos, se observó una disminución en la expresión de las 2 a las 12 h postinfección en los genes asociados a esta vía. Los autores sugieren la presentación de eventos de inmunotolerancia del hospedador a *M. paratuberculosis*.⁴⁰ Es importante tomar en cuenta que los animales utilizados para este estudio estaban naturalmente infectados y que la respuesta inmune tanto Th1 como Th2 actúa de manera simultánea,⁸⁷ por tanto, una disminución de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y los asociados a la proliferación de células hematopoyéticas, pudiera estar asociado a eventos de inmunotolerancia por parte de la micobacteria. Asimismo, respuesta simultánea Th1 y Th2 podría explicar el aumento en la expresión de genes que favorecen la activación de los linfocitos B como *Prkcb*, *Tnfrsf13c* a la segunda semana postvacunación.

También, durante la segunda semana postinfección, hay un aumento en la expresión para los genes *Ifna11*, *Ifna2*, *Ifng*, *Tnfsf4*, *Tnfsf13C*, todos ellos relacionados con la respuesta Th1 y la presentación paucibacilar de la paratuberculosis.^{85,88} Cabe mencionar que la sobreexpresión de *Ifng* se mantiene también en la quinta semana postvacunación. Esta citocina representa uno de los componentes críticos de la respuesta inmune del hospedador para controlar la

infección, ya que es capaz de activar a los macrófagos y estos a su vez, secretan más citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1, IL-2 e IL-8;⁶ de hecho, en este estudio se observó que el gen que codifica para IL-1 β está sobreexpresado en los mismos tiempos que *Ifn γ* (**cuadro 17 y figura 17**). Asimismo, los macrófagos activados son capaces de disminuir la expresión de los receptores de transferrina, por tanto, los niveles de hierro son más bajos y disminuye la disponibilidad del mismo para la replicación de la micobacteria.^{6,11} También en este estudio se encontró una disminución de la expresión de los receptores de transferrina (*Tfrc*) a la quinta semana postvacunación. Asimismo, la segunda semana postvacunación se encontró una sobreexpresión de *Cd40lg* (**cuadro 17 y figura 17**) cuya interacción con el receptor CD40 de los macrófagos es muy importante para activarlos y mantener la respuesta Th1.⁴⁰ Por otro lado, a la quinta semana postvacunación, existe la subexpresión de los genes *Tnfsf8*, *Tnfsf9* (**cuadro 17 y figura 17**), ligandos del TNF, los cuales permiten la proliferación y activación de las células T.⁸⁶ Los datos obtenidos nos sugieren que existe una sobreexpresión de citocinas relacionadas con la respuesta inmune Th1 durante la segunda y quinta semana postvacunación. Cabe mencionar que en infecciones experimentales, no hay expresión significativa de TNF.⁴⁰ La modificación de la expresión de estos genes en los animales inmunizados nos sugiere una respuesta benéfica para el hospedador que permite limitar el número de micobacterias.

En cuanto a los genes relacionados a las vías de señalización celular, hubo una sobreexpresión de los genes *Jak2*, *Stat1*, *Stat6*, *Stat3*, *Traf2*, *Atf2*, *Map3k7*, *Map4k2*, *Stam2* durante la segunda semana postvacunación; *Atf4*, *Cacnb4*, *Tab2*, *RelA*, *Nfat5* en la quinta y *Ikbkg*, *Lcp2*, *Fcer1g*, *Zap70*, *Traf6* en ambas semanas postvacunación. Las proteínas codificadas por estos genes ayudan a la transducción de señales de la célula lo que lleva a la activación de factores de transcripción para posteriormente transcribir y traducir citocinas proinflamatorias, receptores, etc, los cuales favorecen la respuesta inmune del hospedador contra el patógeno.⁸⁶ La infección de macrófagos bovinos por *M. paratuberculosis*, aumenta la expresión de genes relacionados con la inhibición de las señales de

transducción (STAT-induced STAT inhibitor 3). Este gen, regula de manera negativa a la vía Jak-STAT inhibiendo la transducción de señal, se ha reportado la sobreexpresión del mismo en macrófagos de ratón infectados con *M. tuberculosis*.⁹¹

Asimismo, en las vías relacionadas con el tránsito intracelular, hubo un aumento en la expresión del gen *Pik3cb* a la segunda y de los genes *Pik3cd*, *Zfyve20*, *Snf8* a la quinta semana postvacunación. Las PI3K se asocian a la maduración del fagosoma al adquirir proteínas vinculadas con los endosomas tardíos y los lisosomas;⁹² se ha descrito que en infecciones con micobacterias, estas proteínas son eliminadas, lo que ayuda a evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma.⁹³ La sobreexpresión de los genes que se obtuvieron en este estudio, podría facilitar la eliminación de la bacteria al favorecer la unión fagolisosomal. Por el contrario, en este trabajo se encontró la sobreexpresión de los genes que codifican para Rab 4 y Rab 5 a la quinta semana postvacunación, estas proteínas son GTPasas monoméricas involucradas en las etapas tempranas del tránsito intracelular. El fagosoma con *M. paratuberculosis* es capaz de retenerlas para poder evadir la fusión del fagosoma con el lisosoma.³²

También, en la vía de señalización de los receptores de las células T, los genes activados en esta ruta, expresan proteínas que son parte de otras vías de señalización como las de MAPK, las vías NF- κ B, las de regulación del citoesqueleto de actina, la vía de señalización del calcio y la PI3K-Akt. En esta vía existe una sobreexpresión de genes vinculados con vías de señalización celular que permiten la activación de factores de transcripción que finalmente permiten la expresión de citocinas proinflamatorias INF γ , así como citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10. En infecciones experimentales en bovinos, esta vía presenta varios genes que no tienen expresión diferencial o están subexpresados. Por ejemplo, los genes *Cd40lg*, *Cd24*, *Cd28* y *Cd80* no tienen cambios en sus niveles de expresión, estos genes están asociados en la activación de *Pi3k* y *Grb2* que finalmente activa a NF- κ B. Asimismo, *Nfatc1* y *Nfatc4* fueron fuertemente subexpresados. Esto sugiere un defecto en la respuesta inmune del hospedador lo

que favorece a la invasión de la micobacteria.⁴⁰ De manera contraria, en este trabajo hubo mayor cantidad de genes sobreexpresados a la quinta semana postvacunación, asociados a las vías de señalización indicadas anteriormente, sugiriendo una activación de los factores de transcripción que favorece la expresión de diversas citocinas proinflamatorias favoreciendo en control de la proliferación micobacteriana.

Otros hallazgos encontrados en este estudio a través de la técnica de microarreglos fue la alteración de las vías de Diabetes mellitus tipo II, fosforilación oxidativa, enfermedad de Alzheimer y cáncer. En un estudio realizado por Rosu V *et al* (2008) detectaron la presencia de anticuerpos contra *M. paratuberculosis* en pacientes con Diabetes mellitus tipo I; sin embargo, no encontró relación con la de tipo II.⁹⁴ Estos datos nos pueden sugerir el posible potencial zoonótico que tiene esta micobacteria. Por otro lado, tanto la presentación de la enfermedad de Alzheimer, como el cáncer están asociadas a defectos en la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa.^{95,96} Este fenómeno podría explicar los resultados obtenidos debido a que existen genes compartidos por las tres vías que modificaron su expresión de manera diferencial. Cabe mencionar que la alteración de estas vías también fue encontrada en el estudio de Khare *et al* (2012) donde se analizó el transcriptoma de los bovinos infectados con *M. paratuberculosis* a través de microarreglos.⁴⁰

Es importante señalar que la información generada en estos experimentos es estrictamente exploratoria y nos da una idea de las posibles vías modificadas al momento de aplicar la vacuna. Cabe mencionar que el estudio está limitado sólo a los transcritos y no se toma en cuenta las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales una vez que la proteína es expresada.

Por otro lado, como parte de este estudio también se hizo el monitoreo de los animales diagnosticados previamente como positivos a paratuberculosis utilizados en este trabajo a través de PCR IS900, Zielh-Neelsen y ELISA P35. En los resultados obtenidos, todos los animales inmunizados con P35 fueron

diagnosticados como negativos a PCR IS900 y a la tinción de Zielh-Neelsen. En un estudio realizado por Alzuherri *et al* (1995) al hacer la PCR IS900 en ovinos con presentación paucibacilar de la paratuberculosis, también obtuvieron resultados negativos en todos los animales a diferencia del grupo con presentación multibacilar.⁹⁷ Esto puede relacionarse a la patogenia y presentación de la enfermedad; probablemente, en el momento de tomar las muestras no había bacteremia ni excreción de micobacterias en heces, lo cual no descarta que la infección está presente. Otra posibilidad es que la cantidad de bacterias presentes en las muestras colectadas estén debajo del nivel de sensibilidad de las pruebas. Cabe señalar que todos los muestreos tienen intervalos muy cortos entre cada uno y que por tanto, se pudieron obtener resultados similares.

Por el contrario, estos mismos animales fueron diagnosticados como positivos a paratuberculosis por ELISA P35 lo que indica presencia de anticuerpos contra la proteína P35 en el plasma de los animales. Cabe mencionar que los cuatro muestreos realizados tienen intervalos muy cortos entre cada uno y que por tanto, se pudieron obtener resultados similares en todos. Asimismo, la ELISA P35 utiliza como antígeno al fago P35 recombinante en su superficie,²² por tanto, al ser el mismo antígeno, tanto vacunal como para diagnóstico, esta ELISA no es capaz de distinguir entre animales vacunados y no vacunados lo que representa una desventaja para poder hacer el diagnóstico de los animales seropositivos al utilizar a la proteína P35 como antígeno vacunal.

Finalmente, en la evaluación de la condición corporal se observó que se mantuvo constante en todos los animales en un rango de 2 a 2.5 (**Figura 12**). Cabe señalar que los tiempos evaluados son muy cortos y que la mejora en la condición corporal relacionada con el efecto de la vacunación, es más evidente en tiempos más prolongados a partir de los 60 días.⁹⁸ Asimismo, no se generaron nódulos postvacunales en el sitio de inoculación. Esta condición representa una ventaja comparada con las vacunas comerciales que generan nódulos fibrocáseos que demeritan la calidad de la carne.^{42,46,47,50}

18.0 Conclusiones

- I. Existe una modificación en la expresión de los genes asociados con la respuesta Th1, vías de señalización celular, el tránsito intracelular, adhesión y la respuesta Th2 en los ovinos empleados en este estudio infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y vacunados con el fago P35 recombinante.
- II. El aumento de expresión de los genes *Ifn γ* e *Il1 β* en los diferentes tiempos evaluados, sugieren una respuesta inmune celular, que podría ser capaz de controlar a la infección.
- III. El aumento en la expresión de los genes *Ikbkg*, *Lcp2*, *Fcer1g*, *Zap70*, *Traf6* en los diferentes tiempos evaluados se relacionan con las vías de señalización celular que activan factores de transcripción asociados a la expresión de citocinas que eventualmente contribuyen al control de la infección.
- IV. El aumento en la expresión del gen *Il4* en los diferentes tiempos evaluados, sugiere que existe una expresión simultánea de genes asociados a respuesta Th1 y Th2.
- V. Los tres ovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vacunados con la proteína P35 recombinante no presentan formación de nódulos en el sitio de inoculación.

19.0 Prospectiva

Es necesario comprobar la modificación en la expresión de genes obtenidos en este estudio y también conocer de manera cuantitativa el cambio en la expresión de los mismos por medio de otras técnicas como PCRq o *Northern blot*. Asimismo, también se puede utilizar la citometría de flujo o ELISA para corroborar que las proteínas están siendo expresadas.

En este estudio únicamente se evaluaron las etapas tempranas (las primeras 5 semanas postvacunación) de tres ovinos infectados naturalmente con *M. paratuberculosis*; es pertinente tener conocimientos de los eventos moleculares que suceden en etapas más tardías dado el comportamiento crónico de la infección en un número más grande de animales.

Es apropiado medir la expresión de génica de animales vacunados con el fago M13 y con PBS para conocer si la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune es la misma.

La información generada en estos experimentos abre el panorama para generar nuevas hipótesis y campos de conocimiento en el estudio del efecto vacunal del fago P35 recombinante en animales naturalmente infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

20. ANEXO A

Vías metabólicas y genes con expresión diferencial obtenidas en los diferentes experimentos de microarreglos. En cursivas y negritas se muestran aquellas vías asociadas a la respuesta inmune del hospedador.

EXPERIMENTO A. Vías y genes alterados durante la segunda semana postvacunación

Vías Activadas

<i>Regulación del Citoesqueleto de Actina</i>
<u>FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1</u> <u>Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6</u> <u>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</u> <u>abl-interactor 2</u> <u>cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac</u> <u>cofilin 1, non-muscle; similar to Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform); predicted gene 6180</u> <u>fibroblast growth factor 12</u> <u>fibroblast growth factor 18</u> <u>insulin receptor-related receptor</u> <u>integrin alpha 2</u> <u>integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</u> <u>integrin beta 4</u> <u>myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle</u> <u>myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow</u> <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u> <u>phosphoinositide kinase, FYVE finger containing</u> <u>platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide</u> <u>platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide</u> <u>platelet-derived growth factor, D polypeptide</u> <u>predicted gene 7281; predicted gene 5831; similar to SP140 nuclear body protein (predicted); Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12</u> <u>similar to platelet-derived growth factor B chain; platelet derived growth factor, B polypeptide</u> <u>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</u>
Vía de Señalización PPAR
<u>FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1</u> <u>Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6</u> <u>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</u> <u>abl-interactor 2</u> <u>cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac</u> <u>cofilin 1, non-muscle; similar to Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform); predicted gene 6180</u> <u>fibroblast growth factor 12</u> <u>fibroblast growth factor 18</u> <u>insulin receptor-related receptor</u> <u>integrin alpha 2</u> <u>integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</u> <u>integrin beta 4</u> <u>myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle</u>

myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow
phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide
phosphoinositide kinase, FYVE finger containing
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
platelet-derived growth factor, D polypeptide
predicted gene 7281; predicted gene 5831; similar to SP140 nuclear body protein (predicted); Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12
similar to platelet-derived growth factor B chain; platelet derived growth factor, B polypeptide
v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like

Interacción Citocina-Receptor de Citocina

CD40 ligand
activin A receptor, type 1
bone morphogenetic protein 2
chemokine (C-C motif) receptor 9
interferon alpha 11; hypothetical protein LOC100044216
interferon alpha 2
interferon gamma
interleukin 1 beta
interleukin 2 receptor, alpha chain
interleukin 4
interleukin 9
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
platelet-derived growth factor, D polypeptide
predicted gene 13304; similar to beta chemokine Exodus-2; predicted gene 10591; chemokine (C-C motif) ligand 21B; chemokine (C-C motif) ligand 21C (leucine)
predicted gene 614; interleukin 2 receptor, gamma chain
pro-platelet basic protein
similar to platelet-derived growth factor B chain; platelet derived growth factor, B polypeptide
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c
vascular endothelial growth factor A

Vía de Señalización Jak-STAT

Janus kinase 2
interferon alpha 11; hypothetical protein LOC100044216
interferon alpha 2
interferon gamma
interleukin 2 receptor, alpha chain
interleukin 4
interleukin 9
phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide
predicted gene 614; interleukin 2 receptor, gamma chain
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
signal transducer and activator of transcription 1
signal transducer and activator of transcription 6
signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2
similar to Stat3B; signal transducer and activator of transcription 3
suppressor of cytokine signaling 3

Adhesión

collagen, type III, alpha 1
filamin C, gamma
filamin, alpha

[integrin alpha 2](#)
[integrin beta 1 \(fibronectin receptor beta\)](#)
[integrin beta 4](#)
[integrin linked kinase; predicted gene 6263](#)
[laminin, gamma 1](#)
[myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide](#)
[platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide](#)
[platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide](#)
[platelet-derived growth factor, D polypeptide](#)
[protein kinase C, beta](#)
[similar to platelet-derived growth factor B chain; platelet derived growth factor, B polypeptide](#)
[talin 2](#)
[v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog \(avian\)-like](#)
[vascular endothelial growth factor A](#)

Vía de Señalización MAPK

[RIKEN cDNA 1500003O03 gene; similar to EF-hand Ca2+ binding protein p22](#)
[TNF receptor-associated factor 2](#)
[activating transcription factor 2; similar to Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2 \(Activating transcription factor 2\) \(cAMP response element-binding protein CRE-BP1\) \(MXBP protein\)](#)
[arrestin, beta 1](#)
[calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit](#)
[dual specificity phosphatase 10](#)
[dual specificity phosphatase 6](#)
[fibroblast growth factor 12](#)
[fibroblast growth factor 18](#)
[filamin C, gamma](#)
[filamin, alpha](#)
[interleukin 1 beta](#)
[mitogen-activated protein kinase 7](#)
[mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7; predicted gene 8188](#)
[mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2](#)
[neurofibromatosis 1](#)
[neurotrophin 5](#)
[platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide](#)
[platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide](#)
[protein kinase C, beta](#)
[similar to platelet-derived growth factor B chain; platelet derived growth factor, B polypeptide](#)
[v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog \(avian\)-like](#)

Vías en Cáncer

[EGL nine homolog 2 \(C. elegans\)](#)
[TNF receptor-associated factor 1](#)
[TNF receptor-associated factor 2](#)
[bone morphogenetic protein 2](#)
[deleted in colorectal carcinoma](#)
[dishevelled, dsh homolog 1 \(Drosophila\)](#)
[fibroblast growth factor 18](#)
[frizzled homolog 2 \(Drosophila\)](#)
[hypoxia inducible factor 1, alpha subunit](#)
[integrin alpha 2](#)
[integrin beta 1 \(fibronectin receptor beta\)](#)
[laminin, gamma 1](#)
[matrix metalloproteinase 2](#)

phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
protein kinase C, beta
signal transducer and activator of transcription 1
similar to Stat3B; signal transducer and activator of transcription 3
similar to nuclear pore complex-associated intranuclear coiled-coil protein TPR; translocated promoter region
similar to platelet-derived growth factor B chain; platelet derived growth factor, B polypeptide
v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
vascular endothelial growth factor A
wingless-related MMTV integration site 5A

Immunodeficiencia Primaria

CD4 antigen
CD40 ligand
adenosine deaminase
immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b); Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)
predicted gene 614; interleukin 2 receptor, gamma chain
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c

Citotoxicidad Mediada por Células NK

RIKEN cDNA 1500003O03 gene; similar to EF-hand Ca2+ binding protein p22
immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b); Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)
interferon alpha 11; hypothetical protein LOC100044216
interferon alpha 2
interferon gamma
killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7
natural cytotoxicity triggering receptor 1
phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide
protein kinase C, beta
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
retinoic acid early transcript 1E; retinoic acid early transcript beta; retinoic acid early transcript 1, alpha; retinoic acid early transcript delta; retinoic acid early transcript gamma
similar to natural killer cell receptor-P1; predicted gene 4697; killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1C

Vía de Señalización Wnt

calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
casein kinase 1, alpha 1
casein kinase 2, alpha 1 polypeptide; predicted gene 10031; similar to casein kinase II, alpha 1 polypeptide
dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)
fos-like antigen 1
frizzled homolog 2 (Drosophila)
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7; predicted gene 8188
protein kinase C, beta
protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoform
seven in absentia 1B
transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1
wingless-related MMTV integration site 5A

Enfermedad Autoinmune de la Tiroides

CD40 ligand
CD86 antigen
histocompatibility 2, M region locus 2
immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b); Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)
interferon alpha 11; hypothetical protein LOC100044216
interferon alpha 2

thyroglobulin

EXPERIMENTO A. Vías y genes alterados durante la segunda semana postvacunación

Vías Suprimidas

Metabolismo del Propionato

acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain
aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1
enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial
predicted gene 5182; acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha
succinate-Coenzyme A ligase, GDP-forming, beta subunit

Fosforilación Oxidativa

ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F pseudogene; similar to ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor (ATPase subunit F6); ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit
ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit B
ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit E
ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit A
SZATPase, H+/K+ exchanging, gastric, alpha polypeptide
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1
RIKEN cDNA 1110020P15 gene; predicted gene 6293
cytochrome c oxidase subunit VIIb2
predicted gene 10231; similar to ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9); predicted gene 10175; predicted gene 5911; ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2
predicted gene 6265; similar to cytochrome c oxidase, subunit VIc; cytochrome c oxidase, subunit VIc

Proteasoma

predicted gene 3375; proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 11

Degradación de Lisina

SET domain containing (lysine methyltransferase) 7
SET domain containing 2
enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1

Biosíntesis de Hormonas Esteroideas

NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like
cytochrome P450, family 27, subfamily b, polypeptide 1
lysosomal acid lipase A
sterol-C4-methyl oxidase-like

Carcinoma de Células Basales

bone morphogenetic protein 4
dishevelled 2, dsh homolog (Drosophila)

<u>frizzled homolog 5 (Drosophila)</u> <u>frizzled homolog 8 (Drosophila)</u> <u>similar to adenomatosis polyposis coli; adenomatosis polyposis coli</u> <u>wingless-related MMTV integration site 3</u> <u>wingless-type MMTV integration site 9B</u>
Degradación de la Valina, Leucina e Isoleucina
<u>acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain</u> <u>aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1</u> <u>aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1</u> <u>branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide</u> <u>enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial</u> <u>predicted gene 13910; similar to Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; predicted gene 9108</u>

EXPERIMENTO B. Vías y genes alterados durante la quinta semana postvacunación

Vías Activadas

Vía de Señalización de los Receptores de Células T
<u>CD8 antigen, beta chain 1</u> <u>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; similar to cytotoxic T-lymphocyte associated molecule 4</u> <u>inhibitor of kappaB kinase gamma</u> <u>interferon gamma</u> <u>interleukin 10</u> <u>interleukin 4</u> <u>lymphocyte cytosolic protein 2</u> <u>nuclear factor of activated T-cells 5</u> <u>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene</u> <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u> <u>phospholipase C, gamma 1</u> <u>similar to SH2/SH3 adaptor protein; non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2; predicted gene 6226</u> <u>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</u>
Endocitosis
<u>ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2</u> <u>G protein-coupled receptor kinase 5</u> <u>G protein-coupled receptor kinase-interactor 2</u> <u>RAB4A, member RAS oncogene family</u> <u>SH3-domain GRB2-like 1</u> <u>arrestin, beta 1</u> <u>chromatin modifying protein 1B; RIKEN cDNA 2610002M06 gene</u> <u>histocompatibility 2, Q region locus 1; histocompatibility 2, Q region locus 9; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain precursor; histocompatibility 2, Q region locus 8; histocompatibility 2, Q region locus 2; similar to MHC class Ib antigen; histocompatibility 2, Q region locus 7; histocompatibility 2, Q region locus 6; hypothetical protein LOC100044307; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain precursor (QA-2 antigen); RIKEN cDNA 0610037M15 gene</u> <u>itchy, E3 ubiquitin protein ligase</u> <u>kinase insert domain protein receptor</u> <u>par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)</u> <u>predicted gene 8712; SNF8, ESCRT-II complex subunit, homolog (S. cerevisiae)</u> <u>ret proto-oncogene</u> <u>similar to vacuolar protein sorting 4b; vacuolar protein sorting 4b (yeast)</u>

<u>transferrin receptor</u> <u>vacuolar protein sorting 37A (yeast); similar to Vps37a protein</u> <u>zinc finger, FYVE domain containing 20</u>
Diabetes mellitus Tipo II
<u>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</u> <u>glucokinase</u> <u>hexokinase 1</u> <u>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene</u> <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u> <u>protein kinase C, delta</u>
Vía de Señalización de la Insulina
<u>acetyl-Coenzyme A carboxylase beta</u> <u>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</u> <u>fatty acid synthase</u> <u>glucokinase</u> <u>hexokinase 1</u> <u>insulin receptor substrate 2</u> <u>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene</u> <u>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide</u> <u>phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited</u> <u>phosphorylase kinase alpha 2</u> <u>predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308</u> <u>protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha</u> <u>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha</u>
Biosíntesis de Ácidos Grasos
<u>3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial</u> <u>acetyl-Coenzyme A carboxylase beta</u> <u>fatty acid synthase</u>
Vía de Señalización del Calcio
<u>adenosine A2a receptor</u> <u>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</u> <u>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta</u> <u>cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS</u> <u>glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4)</u> <u>guanine nucleotide binding protein, alpha 11</u> <u>phospholamban</u> <u>phospholipase C, delta 4</u> <u>phospholipase C, gamma 1</u> <u>phospholipase C, zeta 1</u> <u>phosphorylase kinase alpha 2</u> <u>predicted gene 5353; immunoglobulin heavy chain (J558 family); similar to Ig heavy chain V region 108A precursor; similar to Ig heavy chain V-I region V35 precursor; predicted gene 900; immunoglobulin heavy chain complex; similar to Ig H-chain V-JH1-region; immunoglobulin heavy variable V1-31; immunoglobulin heavy chain 2 (serum IgA)</u> <u>predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308</u> <u>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha</u> <u>solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 31</u> <u>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</u>
Vía de señalización de Fc epsilon RI
<u>Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide</u> <u>interleukin 4</u> <u>lymphocyte cytosolic protein 2</u>

[phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide](#)
[phospholipase A2, group VI](#)
[phospholipase C, gamma 1](#)
[predicted gene 5353; immunoglobulin heavy chain \(J558 family\); similar to Ig heavy chain V region 108A precursor; similar to Ig heavy chain V-I region V35 precursor; predicted gene 900; immunoglobulin heavy chain complex; similar to Ig H-chain V-JH1-region; immunoglobulin heavy variable V1-31; immunoglobulin heavy chain 2 \(serum IgA\)](#)
[protein kinase C, delta](#)

Vía de Señalización de Neurotrofina

[activating transcription factor 4](#)
[calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta](#)
[insulin receptor substrate 2](#)
[neurotrophin 5](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide](#)
[phospholipase C, gamma 1](#)
[predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308](#)
[predicted gene, EG546165; predicted gene 2423; hypothetical protein LOC674211; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide](#)
[protein kinase C, delta](#)
[protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11](#)
[v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A \(avian\)](#)

Leucemia mieloide aguda

[SFFV proviral integration 1](#)
[cyclin A1](#)
[eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1](#)
[inhibitor of kappaB kinase gamma](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide](#)

Cáncer Pancreático

[Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor \(GEF\) 6](#)
[cyclin-dependent kinase inhibitor 2A](#)
[inhibitor of kappaB kinase gamma](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide](#)
[v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog \(avian\)](#)
[v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A \(avian\)](#)
[vascular endothelial growth factor A](#)

Vía de Señalización VEGF

[heat shock protein 1](#)
[kinase insert domain protein receptor](#)
[nuclear factor of activated T-cells 5](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide](#)
[phospholipase A2, group VI](#)
[phospholipase C, gamma 1](#)
[vascular endothelial growth factor A](#)

Vías en el Cáncer

[SFFV proviral integration 1](#)
[cyclin-dependent kinase inhibitor 2A](#)
[fibroblast growth factor 12](#)
[fibroblast growth factor 9](#)

[frizzled homolog 1 \(Drosophila\)](#)
[frizzled homolog 2 \(Drosophila\)](#)
[inhibitor of kappaB kinase gamma](#)
[integrin alpha 6](#)
[laminin, alpha 1](#)
[laminin, gamma 1](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide; RIKEN cDNA 2610208K16 gene](#)
[phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide](#)
[phospholipase C, gamma 1](#)
[ret proto-oncogene](#)
[suppressor of fused homolog \(Drosophila\)](#)
[v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog \(avian\)](#)
[v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A \(avian\)](#)
[vascular endothelial growth factor A](#)
[wingless-related MMTV integration site 2](#)
[wingless-related MMTV integration site 4](#)
[wingless-related MMTV integration site 5B](#)

Enfermedad de Alzheimer

[NADH dehydrogenase \(ubiquinone\) 1 alpha subcomplex, 2](#)
[NADH dehydrogenase \(ubiquinone\) 1 alpha subcomplex, 5](#)
[NADH dehydrogenase \(ubiquinone\) 1 alpha subcomplex, 7 \(B14.5a\)](#)
[a disintegrin and metallopeptidase domain 10](#)
[amyloid beta \(A4\) precursor protein](#)
[apolipoprotein E](#)
[calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit](#)
[cytochrome c oxidase, subunit VIb polypeptide 1](#)
[endoplasmic reticulum \(ER\) to nucleus signalling 1](#)
[glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D \(epsilon 4\)](#)
[interleukin 1 beta](#)
[predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308](#)
[ubiquinol-cytochrome c reductase \(6.4kD\) subunit; similar to ubiquinol-cytochrome c reductase subunit](#)
[ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1](#)

Vía de Señalización de GnRH

[activating transcription factor 4](#)
[calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit](#)
[calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta](#)
[glycoprotein hormones, alpha subunit](#)
[guanine nucleotide binding protein, alpha 11](#)
[phospholipase A2, group VI](#)
[predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308](#)
[protein kinase C, delta](#)
[protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha](#)

Metabolismo de la Sacarosa y el Almidón

[amylase 1, salivary](#)
[glucokinase](#)
[hexokinase 1](#)
[phosphoglucomutase 1](#)
[phosphoglucomutase 2](#)

Melanogénesis

[calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta](#)
[frizzled homolog 1 \(Drosophila\)](#)
[frizzled homolog 2 \(Drosophila\)](#)

guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting 1
predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308
protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha
wingless-related MMTV integration site 2
wingless-related MMTV integration site 4
wingless-related MMTV integration site 5B

Vía de Señalización de MAPK

activating transcription factor 4
arrestin, beta 1
calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit
dual specificity phosphatase 10
fibroblast growth factor 12
fibroblast growth factor 2
fibroblast growth factor 9
filamin C, gamma
heat shock protein 1
inhibitor of kappaB kinase gamma
interleukin 1 beta
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2
neurotrophin 5
phospholipase A2, group VI
protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha
stathmin 1; predicted gene 11223; predicted gene 6393
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)

EXPERIMENTO B. Vías y genes alterados durante la quinta semana postvacunación

Vías Suprimidas

Metabolismo del Retinol

UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5
alcohol dehydrogenase 1 (class I)
cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 65
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44
retinol dehydrogenase 5
similar to DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide (RPB10) (RPB7.6) (RPABC5); hypothetical protein LOC100044218; predicted gene 13015; polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 31; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 32; predicted gene 10774; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10

Biosíntesis de Hormonas Esteroides

UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5
catechol-O-methyltransferase 1
cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 2
cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1

<u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44</u> <u>predicted gene 4450; hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 4; predicted gene 10681</u>
Metabolismo de Fármacos
<u>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5</u> <u>alcohol dehydrogenase 1 (class I)</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 65</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44</u>
Metabolismos de Xenobióticos por Citocromo P450
<u>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5</u> <u>alcohol dehydrogenase 1 (class I)</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 65</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44</u>
Metabolismo de Ácido Linoléico
<u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38</u> <u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 65</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44</u>
Metabolismo de Fármacos
<u>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16</u> <u>cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44</u> <u>esterase 31; predicted gene 4738</u> <u>predicted gene 15210; inosine 5'-phosphate dehydrogenase 2</u>
Interacción citocina-receptor de citocina
<u>cardiotrophin 1</u> <u>chemokine (C-C motif) ligand 28</u> <u>chemokine (C-C motif) ligand 9</u> <u>chemokine (C-X-C motif) ligand 16</u> <u>colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)</u> <u>ectodysplasin-A receptor</u> <u>inhibin beta-C</u> <u>interleukin 10-related T cell-derived inducible factor beta; interleukin 22</u> <u>interleukin 11 receptor, alpha chain 2; predicted gene 13305; predicted gene, 100038993</u> <u>interleukin 3</u> <u>prolactin</u>

<p><u>similar to EDA-A1; ectodysplasin-A</u></p> <p><u>similar to Small inducible cytokine B11 precursor (CXCL11) (Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) (I-TAC); chemokine (C-X-C motif) ligand 11</u></p> <p><u>transforming growth factor, beta receptor II</u></p> <p><u>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8</u></p> <p><u>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9</u></p>
Metabolismo de Tirosina
<p><u>alcohol dehydrogenase 1 (class I)</u></p> <p><u>catechol-O-methyltransferase 1</u></p> <p><u>fumarylacetoacetate hydrolase</u></p> <p><u>patatin-like phospholipase domain containing 3</u></p> <p><u>predicted gene 6097; macrophage migration inhibitory factor: similar to macrophage migration inhibitory factor; predicted gene 8762; predicted gene 10169; macrophage migration inhibitory factor-like</u></p>
Metabolismo del Ácido Araquidónico
<p><u>cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10</u></p> <p><u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29</u></p> <p><u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38</u></p> <p><u>cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 65</u></p> <p><u>cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15</u></p> <p><u>gamma-glutamyltransferase 6</u></p> <p><u>similar to DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide (RPB10) (RPB7.6) (RPABC5); hypothetical protein LOC100044218; predicted gene 13015; polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 31; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 32; predicted gene 10774; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10</u></p>
Linaje de Células Hematopoyéticas
<p><u>CD37 antigen</u></p> <p><u>CD5 antigen</u></p> <p><u>CD59a antigen</u></p> <p><u>interleukin 11 receptor, alpha chain 2; predicted gene 13305; predicted gene, 100038993</u></p> <p><u>interleukin 3</u></p> <p><u>predicted gene 5353; immunoglobulin heavy chain (J558 family); similar to Ig heavy chain V region 108A precursor; similar to Ig heavy chain V-I region V35 precursor; predicted gene 900; immunoglobulin heavy chain complex; similar to Ig H-chain V-JH1-region; immunoglobulin heavy variable V1-31; immunoglobulin heavy chain 2 (serum IgA)</u></p> <p><u>transferrin receptor</u></p>

EXPERIMENTO C. Vías y genes alterados durante la semana 2 y la semana 5 postvacunación
Vías Activadas

Vía de Señalización de los Receptores de Células T
<p><u>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; similar to cytotoxic T-lymphocyte associated molecule 4</u></p> <p><u>inhibitor of kappaB kinase gamma</u></p> <p><u>lymphocyte cytosolic protein 2</u></p> <p><u>phospholipase C, gamma 1</u></p> <p><u>similar to SH2/SH3 adaptor protein; non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2; predicted gene 6226</u></p> <p><u>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</u></p> <p><u>zeta-chain (TCR) associated protein kinase</u></p>
Vía de Señalización de la Insulina
<p><u>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</u></p> <p><u>glucokinase</u></p>

<p>hexokinase 1 hexokinase 2 phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic phosphorylase kinase alpha 2 predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308 protein kinase C, zeta protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1 sorbin and SH3 domain containing 1 v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</p>
Enfermedad Autoinmune de la Tiroides
<p>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8 glucokinase hexokinase 1 hexokinase 2 protein kinase C, zeta</p>
Vía de Señalización de Neurotrofina
<p>TNF receptor-associated factor 6 interleukin-1 receptor-associated kinase 3 phospholipase C, gamma 1 predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308 predicted gene, EG546165; predicted gene 2423; hypothetical protein LOC674211; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide sortilin 1 v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</p>
Leucemia Mieloide Aguda
<p>cyclin A1 eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 inhibitor of kappaB kinase gamma ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1 v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</p>
Cáncer Pancreático
<p>inhibitor of kappaB kinase gamma transforming growth factor alpha v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</p>
Vía de Señalización del Calcio
<p>adenosine A2a receptor cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4) guanine nucleotide binding protein, alpha 11 immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b); Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide) phospholamban phospholipase C, delta 4 phospholipase C, gamma 1 phosphorylase kinase alpha 2 platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308 protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha</p>

v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)

Vías en el Cáncer

GLI-Kruppel family member GLI3

TNF receptor-associated factor 6

adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1

bone morphogenetic protein 2

frizzled homolog 1 (Drosophila)

inhibitor of kappaB kinase gamma

laminin, beta 2

laminin, gamma 1

microphthalmia-associated transcription factor

mutS homolog 2 (E. coli)

mutS homolog 3 (E. coli)

nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100

phospholipase C, gamma 1

platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide

predicted gene 10124; predicted gene 6340; CDC28 protein kinase 1b

ret proto-oncogene

suppressor of fused homolog (Drosophila)

transforming growth factor alpha

v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)

v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog

v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)

von Hippel-Lindau syndrome

wingless-related MMTV integration site 11

wingless-related MMTV integration site 2

Vía de Señalización VEGF

heat shock protein 1

kinase insert domain protein receptor

phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)

phospholipase A2, group VI

phospholipase A2, group XIA

phospholipase C, gamma 1

Endocitosis

ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1

G protein-coupled receptor kinase 5

G protein-coupled receptor kinase-interactor 2

RAB4A, member RAS oncogene family

RAB5C, member RAS oncogene family

TNF receptor-associated factor 6

chromatin modifying protein 2A

chromatin modifying protein 4C; similar to chromatin modifying protein 4C

clathrin, light polypeptide (Lcb)

dynamin 3

hypothetical protein LOC100044229; adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit

kinase insert domain protein receptor

neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4-like

par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)

par-6 (partitioning defective 6,) homolog alpha (C. elegans)

platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide

predicted gene 8712; SNF8, ESCRT-II complex subunit, homolog (S. cerevisiae)

predicted gene 8717; adaptor protein complex AP-2, mu1

<p><u>protein kinase C, zeta</u> <u>ret proto-oncogene</u> <u>similar to histocompatibility 2, T region locus 24; histocompatibility 2, T region locus 24</u> <u>transferrin receptor</u></p>
Vía de Señalización de GnRH
<p><u>glycoprotein hormones, alpha subunit</u> <u>guanine nucleotide binding protein, alpha 11</u> <u>phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)</u> <u>phospholipase A2, group VI</u> <u>phospholipase A2, group XIA</u> <u>predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308</u> <u>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha</u></p>
Vía de Señalización de Fc epsilon RI
<p><u>Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide</u> <u>immunoglobulin heavy chain 3 (serum IgG2b); Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)</u> <u>lymphocyte cytosolic protein 2</u> <u>phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)</u> <u>phospholipase A2, group VI</u> <u>phospholipase A2, group XIA</u> <u>phospholipase C, gamma 1</u></p>
Melanogénesis
<p><u>frizzled homolog 1 (Drosophila)</u> <u>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting 2; similar to Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit (Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein)</u> <u>microphthalmia-associated transcription factor</u> <u>predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308</u> <u>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha</u> <u>wingless-related MMTV integration site 11</u> <u>wingless-related MMTV integration site 2</u></p>
Potenciación a Largo Plazo
<p><u>glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4)</u> <u>predicted gene 7743; calmodulin 3; calmodulin 2; calmodulin 1; predicted gene 7308</u> <u>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha</u> <u>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</u></p>
Vía de Señalización Hedgehog
<p><u>F-box and WD-40 domain protein 11</u> <u>GLI-Kruppel family member GLI3</u> <u>bone morphogenetic protein 2</u> <u>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha</u> <u>suppressor of fused homolog (Drosophila)</u> <u>wingless-related MMTV integration site 11</u> <u>wingless-related MMTV integration site 2</u></p>
Carcinoma de Células Basales
<p><u>GLI-Kruppel family member GLI3</u> <u>bone morphogenetic protein 2</u> <u>frizzled homolog 1 (Drosophila)</u> <u>suppressor of fused homolog (Drosophila)</u> <u>wingless-related MMTV integration site 11</u> <u>wingless-related MMTV integration site 2</u></p>

EXPERIMENTO C. Vías y genes alterados durante la semana 2 y la semana 5 postvacunación

Vías Suprimida

Fosforilación Oxidativa
<u>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F pseudogene; similar to ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor (ATPase subunit F6); ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F</u>
<u>ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A2</u>
<u>ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit B2</u>
<u>ATPase, H+/K+ exchanging, gastric, alpha polypeptide</u>
<u>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1</u>
<u>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1</u>
<u>cytochrome c oxidase subunit VIIb2</u>
<u>succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein</u>
Enfermedad de Alzheimer
<u>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F pseudogene; similar to ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor (ATPase subunit F6); ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F</u>
<u>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1</u>
<u>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</u>
<u>cytochrome c oxidase subunit VIIb2</u>
<u>cytochrome c, testis</u>
<u>insulin degrading enzyme</u>
<u>predicted gene 15429; anterior pharynx defective 1a homolog (C. elegans)</u>
<u>ryanodine receptor 3</u>
<u>succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein</u>

21.0 Literatura citada

1. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2012; capítulo 8.9. [consultado el 03 junio 13]. Disponible en el sitio red: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-terrestre/acceso-en-linea/?htmfile=sommaire.htm>
2. The Center for Food Security & Public Health. Paratuberculosis. Enfermedad de Johne. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. OIE. 2007;1-7.
3. Sweeney RW. Pathogenesis of paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011; 27(3):537-46.
4. Miranda BMV. Evaluación del impacto económico de la Paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo, México. Tesis de Maestría. México D.F.: FMVZ-UNAM, 2005.

-
5. Mendoza J, Lana R, Díaz-Rubio M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(4):417–422.
 6. Coussens PM. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev*. 2001;2(2):141-61.
 7. Sung N, Collins MT. Thermal Tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(3): 999–1005.
 8. Stabel JR. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J Dairy Sci*. 2001;84(2):524-7.
 9. Taxonomy Browser (*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, *National Center of Biotechnology Information (NCBI)*, 2013; [consultado el 17 noviembre 13]. Disponible en el sitio red: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1770&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
 10. De Juan FL. Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. Tesis de Doctorado. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, 2005.
 11. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3):489-512.
 12. Brenner DJ, Krieg NR, George MG, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Mycobacterium*, Parte 5. 2ª ed. USA: Springer, 2005.
 13. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):697-714.
 14. Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, *et al*. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(35):12344-9.
 15. He Z, De Buck J. Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteomic analysis. *Proteome Sci*. 2010;8(21): 1-9.
 16. Bannantine JP, Huntley JF, Miltner E, Stabel JR, Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiol*. 2003;149(8):2061-9.

-
17. Winter N, Triccas JA, Rivoire B, Pessolani MC, Eiglmeir K, *et al.* Characterization of the gene encoding the immunodominant 35 kDa protein of *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol.* 2005;16: 865-876.
18. Triccas JA, Roche PW, Winter N, Feng CG, Butlin CR, Britton WJ. A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 1996;64(12):5171-7.
19. Gen Bank. 35 kDa protein [*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*]; 2011. [consultado el 04 junio 13] Disponible en el sitio red: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/6433980>
20. Bannantine JP, Huntley JF, Miltner E, Stabel JR, Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiol.* 2003;149(8):2061-9.
21. Basagoudanavar SH, Goswami PP, Tiwari V. Cellular immune responses to 35 kDa recombinant antigen of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Vet Res Commun.* 2006;30(4):357-67.
22. Castrellón AVE. Expresión de la proteína recombinante P35 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y su uso en diagnóstico de paratuberculosis en ovinos. Tesis de Maestría. México D.F.: FMVZ-UNAM, 2013.
23. Pribylova R, Kralik P, Donnelly N, Matiasovic J, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and the expression of selected virulence and pathogenesis genes in response to 6°C, 65°C and pH 2.0. *Braz J Microbiol.* 2011;42(2):807-17.
24. Alonso-Hearn M, Eckstein TM, Sommer S, Bermudez LE. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxR regulates cell envelope and virulence. *Innate Immun.* 2010 Aug;16(4):235-47. doi: 10.1177/1753425909339811. Epub 2009 Aug 26.
25. Bannantine JP, Barletta RG, Thoen CO, Andrews RE Jr. Identification of *Mycobacterium paratuberculosis* gene expression signals. *Microbiol.* 1997;143 (Pt 3):921-8.
26. Wu CW, Schmoller SK, Bannantine JP, Eckstein TM, Inamine JM, *et al.* A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microb Pathog.* 2009;46(4):222-30.

-
- 27.** Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol.* 2005;156(5-6):626-33.
- 28.** Cook KL, Britt JS, Bolster CH. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biofilms on livestock watering trough materials. *Vet Microbiol.* 2010 24;141(1-2):103-9.
- 29.** Coussens PM. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect Immun.* 2004;72(6):3089-96.
- 30.** Woo SR, Czuprynski CJ. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *J Vet Sci.* 2008;9(1):1-8.
- 31.** Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res Int.* 2013;2013:908348.
- 32.** Kuehnel MP, Goethe R, Habermann A, Mueller E, Rohde M, *et al.* Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol.* 2001;3(8):551-66.
- 33.** Coussens PM, Kabara E. Infection of primary bovine macrophages with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses host cell apoptosis. *Front Microbiol.* 2012;3(215):1-10.
- 34.** Bautista G. Importancia de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la respuesta inmunitaria de los bovinos. *Vet Méx.* 2011;42(1): 65-75.
- 35.** Ramírez SJ, Chávez GL, Santillán TJL, Guzmán LS. Microarreglos de ADN: Fabricación, proceso y análisis. Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos. 2014; capítulo 9 [consultado el 03 mayo 15]. Disponible en el sitio red: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/microarreglos.pdf>
- 36.** Trevino V, Falciani F, Barrera SAH. DNA Microarrays: a Powerful Genomic Tool for Biomedical and Clinical Research. *Mol Med.* 2007; 13(9-10): 527–541.
- 37.** Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis.* 2000;6(5):513-25.

-
- 38.** Smeed JA, Watkins CA, Gossner AG, Hopkins J. Expression profiling reveals differences in immuno-inflammatory gene expression between the two disease forms of sheep paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;135(3-4):218-25.
- 39.** Purdie AC, Plain KM, Begg DJ, de Silva K, Whittington RJ. Expression of genes associated with the antigen presentation and processing pathway are consistently regulated in early *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012;35(2):151-62.
- 40.** Khare S, Lawhon SD, Drake KL, Nunes JE, Figueiredo JF, Rossetti CA, Gull T, Everts RE, Lewin HA, Galindo CL, Garner HR, Adams LG. Systems biology analysis of gene expression during *In vivo Mycobacterium avium paratuberculosis* enteric colonization reveals role for immune tolerance. *PLoS One.* 2012;7(8).
- 41.** Verschoor CP, Pant SD, You Q, Kelton DF, Karrow NA. Gene expression profiling of PBMCs from Holstein and Jersey cows sub-clinically infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;137(1-2):1-11.
- 42.** Castellanos L, Aranaz A. ParaTBTools: Herramientas para el diagnóstico de la paratuberculosis. *PVALBEITAR* 2009; 124:8-11.
- 43.** Favila HL, Hernández CR, Chávez GG. Detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche de cabras por PCR en México. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos; 2007 1-3; Mendoza, Argentina.
- 44.** Andrzej GAM. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in sheep: aspects of diagnosis and immunity. Tesis de Doctorado. Nueva Zelanda: Massey University, 1999.
- 45.** Sergeant ES, Marshall DJ, Eamens GJ, Kearns C, Whittington RJ. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev Vet Med.* 2003;61(4):235-48.
- 46.** Patton EA. Paratuberculosis vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011;27(3):573-80.
- 47.** Bastida F, Juste RA. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2011; 9(8):1-17.

-
- 48.** Chávez GG. Plan Estratégico del Programa para la Atención de la Paratuberculosis en Ganado Bovino, Ovino y Caprino en México. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México (DF): CONASA, 2010
- 49.** Faisal SM, Chen JW, Yan F, Chen TT, Useh NM, *et al.* Evaluation of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* leuD mutant as a vaccine candidate against challenge in a caprine model. Clin Vaccine Immunol. 2013; 20(4):572-81.
- 50.** Juste RA. Slow infection control by vaccination: Paratuberculosis. Vet Immunol Immunopathol. 2012; 148(1-2):190-6.
- 51.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Tuberculosis Bovina; 2015. [consultado el 03 mayo 15]. Disponible en el sitio red: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4367>
- 52.** Barry C, Corbett D, Bakker D, Andersen P, McNair J, *et al.* The Effect of *Mycobacterium avium* Complex Infections on Routine *Mycobacterium bovis* Diagnostic Tests. Vet Med Int. 2011; p. 145092.
- 53.** Windsor PA. Understanding the efficacy of vaccination in controlling ovine paratuberculosis. Small Rum Res. 2013; 110(2-3): 161–164.
- 54.** Juste RA, Perez V. Control of paratuberculosis in sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011; 27(1):127-38.
- 55.** National Johne's Disease Program. History of OJD in Australia; 2014. [consultado el 18 mayo 14]. Disponible en el sitio red: <http://www.ojd.com.au/australias-ojd-program/history-of-ojd-in-australia/>
- 56.** Windsor P. Research into vaccination against ovine Johne's disease in Australia. Small Rum Res. 2006;62:139–142.
- 57.** National Johne's Disease Program. New OJD Management Plan 2013-2018; 2014. [consultado el 18 mayo 14]. Disponible en el sitio red: <http://www.ojd.com.au/australias-ojd-program/new-ojd-management-plan-2013-2018/>
- 58.** Fridriksdottir V, Gunnarsson E, Sigurdarson S, Gudmundsdottir KB. Paratuberculosis in Iceland: epidemiology and control measures, past and present. Vet Microbiol. 2000;77(3-4):263-7.
- 59.** Carter MA. Prevalence and prevention of paratuberculosis in North America. Jpn J Vet Res. 2012;60: Supl:S9-18.

-
- 60.** Boehringer Ingelheim. Mycopar®; 2014. [consultado el 18 mayo 14]. Disponible en el sitio red: <http://www.bi-vetmedica.com/main/cattle/mycopar.html>
- 61.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Boletín Sanidades N°17. Exportación de Ganado Bovino en Pie a los E.U.A; 2013. [consultado el 18 mayo 14]. Disponible en el sitio red: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=25335>
- 62.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Tuberculosis Bovina; 2013. [consultado el 02 enero 14]. Disponible en el sitio red: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4412>
- 63.** Koets A, Hoek A, Langelaar M, Overdijk M, Santema W, et al. Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine*. 2006;24(14):2550-9.
- 64.** Kathaperumal K, Park SU, McDonough S, Stehman S, Akey B, et al. Vaccination with recombinant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins induces differential immune responses and protects calves against infection by oral challenge. *Vaccine*. 2008;26(13):1652-63.
- 65.** Kathaperumal K, Kumanan V, McDonough S, Chen LH, Park SU, et al. Evaluation of immune responses and protective efficacy in goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine*. 2009;27(1):123-35.
- 66.** Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen SS, Jungersen G. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Vet Microbiol*. 2011;152(1-2):1-20.
- 67.** Galfrè G, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, et al. Immunization with phage-displayed mimotopes. *Methods Enzymol*. 1996;267:109-15.
- 68.** Brigati JR, Petrenko VA. Thermostability of landscape phage probes. *Anal Bioanal Chem*. 2005 ;382(6):1346-50. Epub 2005 Jun 18.
- 69.** Sartorius R, Bettua C, D'Apice L, Caivano A, Trovato M, et al. Vaccination with filamentous bacteriophages targeting DEC-205 induces DC maturation and potent anti-tumor T-cell responses in the absence of adjuvants. *Eu J Immunol*. 2011; 41(9): 2573-2584.

-
- 70.** Samoylova TI, Norris MD, Samoylov AM, Cochran AM, Wolfe KG, *et al.* Infective and inactivated filamentous phage as carriers for immunogenic peptides. *J Virol Methods.* 2012;183(1):63-68.
- 71.** Manoutcharian K, Gevorkian G, Cano A, Almagro JC. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol.* 2001;2(3):217-23.
- 72.** Bradford M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgramo quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 1: 248-254.
- 73.** Castrellón AVE. Evaluación del fago recombinante P35 como vacuna en ovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Tesis de Doctorado inédita. México D.F.: FMVZ-UNAM, 2015.
- 74.** López YJ. Evaluación de estrategias de control en paratuberculosis en hatos bovinos y rebaños caprinos, ovinos y ciervos afectados en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano. Tesis de Maestría. México D.F.: FMVZ-UNAM, 2014.
- 75.** De Lucas TJ. Evaluación de la condición corporal en ovejas. Fortalecimiento del Sistema Producto Ovinos. Tecnologías para Ovinocultores. Serie: Producción, Sistema producto ovino. 2008 [consultado el 18 de junio de 2015]. Disponible en el sitio [red: http://www.asmexcriadoresdeovinos.org/sistema/pdf/produccion/evaluaciondelcondicion.pdf](http://www.asmexcriadoresdeovinos.org/sistema/pdf/produccion/evaluaciondelcondicion.pdf)
- 76.** Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
- 77.** Weiss DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamsen MS. Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 2004 Jul;41(4):326-37.
- 78.** Gómez MAP, Corral GG. genArise: herramienta software para el análisis de microarreglos. Tesis de Licenciatura. México D.F.: Facultad de Ciencias-UNAM, 2005.
- 79.** Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Principios de Producción de Vacunas Veterinarias, 2008; capítulo 1.1.8. [consultado el 08 junio 14]. Disponible en el sitio [red:](#)

http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.08.%20Principios%20de%20producci%C3%B3n%20de%20vacunas%20veterin.pdf

80. Ethiopia Sheep and Goat Productivity Improvement Program (ESGPIP). Giving Injections to Sheep and Goats. Technical Bulletin N°10; 2007. [consultado el 08 junio 14]. Disponible en el sitio red: <http://www.esgPIP.org/PDF/Technical%20bulletin%20No.%2010.pdf>

81. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 2003;4(5):P3.

82. Murphy JT, Sommer S, Kabara EA, Verman N, Kuelbs MA, *et al.* Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol Genomics.* 2006;28(1):67-75.

83. Thirunavukkarasu S, Plain KM, de Silva K, Begg D, Whittington RJ, *et al.* Expression of genes associated with cholesterol and lipid metabolism identified as a novel pathway in the early pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;160(3-4):147-57.

84. Watkins, C.A., Roberts, I.M. and Jones, A.T. Comparative expression profiling in the three defined forms of ovine paratuberculosis. *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis.* Bilbao, Spain, 1992: p 35 – 38.

85. Monsurrò V, Marincola FM. Microarray analysis for a comprehensive immunological-status evaluation during cancer vaccine immune monitoring. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:307297.

86. Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T. Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis. *Vaccine.* 2006;24(7):921-30.

87. Rossi G, Nigro G, Tattoli I, Vincenzetti S, Mariani P. Adhesion molecules and cytokine profile in ileal tissue of sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect.* 2009;11(6-7):698-706.

88. Kindt TJ, Golsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby.* Sexta edición. USA, McGraw-Hill Interamericana. 2007.

-
- 89.** Smeed JA, Watkins CA, Rhind SM, Hopkins J. Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Vet. Res.* 2007; 3:18.
- 90.** Smeed JA, Watkins CA, Gossner AG, Hopkins J. Expression profiling reveals differences in immuno-inflammatory gene expression between the two diseaseforms of sheep paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;135(3-4):218-25..
- 91.** Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, Drenkow J, Shi S, *et al.* Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med.* 2001;194(8):1123-40.
- 92.** Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol.* 2001;154(3):631-44.
- 93.** Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, *et al.* From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Research.* 2014;45(1):54.
- 94.** Rosu V, Ahmed N, Paccagnini D, Pacifico A, Zanetti S, *et al.* *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is not associated with type-2 Diabetes Mellitus. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008;7:9.
- 95.** Manczak M, Park BS, Jung Y, Reddy H. Differential expression of oxidative phosphorylation genes with Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Medicine.* 2004;5: 147-162.
- 96.** Solaini G, Sgarbi G, Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cell. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011;1807: 534-542.
- 97.** Alzuherri HM, Woodall CJ, Clarke CJ. Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;49(4):331-45.
- 98.** Singh VS, Gupta S, Chaubey KK, KumarN, Rawat KD, *et al.* Dose Standardization Studies of 'Indigenous Vaccine' for the Control of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Naturally Infected Goats. *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* 2 (IS): 17 – 2.