



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Evaluación de la mutante *aroA* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, como  
candidato a inmunógeno en el modelo murino**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**CRISTINA IBARRA ZAZUETA**

**TUTOR:**

**DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO**

**(PROGRAMA DE DOCTORADO CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL, CENID BACTERIOLOGIA INIFAP)**

**COMITÉ TUTORAL:**

**RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO**

**(HOSPITAL GRAL. DR. MANUEL GEA GONZALEZ)**

**BEATRIZ ARELLANO REYNOSO**

**(FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA)**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉXICO, ENERO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Dedicatorias**

A mis padres Emilia Zazueta Ramos y Octavio Ibarra Meraz, por apoyar y respetar mis decisiones, por enseñarme el amor a la familia y el respeto y cariño a los animales. Porque sin el apoyo y comprensión de ustedes nunca habría logrado este objetivo. Mejores padres no pude tener, los quiero mucho.

A mi esposo, José Alberto Orduña Sumarán, por siempre creer en mí, en levantarme cuando me sentía derrotada en mi paso por el doctorado, por formar juntos la hermosa familia que tenemos, Luz Cristina y Alberto Jr, definitivamente una bendición en nuestras vidas. Te amo amor.

A mi hermana María Emilia Ibarra Zazueta por ser mi mejor amiga, te quiero mucho hermana.

A mis sobrinos Gabriel Emilio y Santiago Heredia Ibarra, el estar lejos de ustedes por tanto tiempo y no verlos crecer y convivir con ustedes, fue un proceso muy difícil para mí. Los quiero mucho.

A mi suegra María Teresa Orduña Sumarán, por siempre estar al pendiente de mí y mi familia, la quiero mucho.

A mis unidades experimentales, mis ratones Balb/c, por su valiosa aportación con los datos observados durante los experimentos de la evaluación de la mutante usada como inmunógeno en el modelo murino.

A un ser vivo muy especial para mí, mi mascota Ozy, (1994 – 2008), que fue la inspiración para que estudiara Medicina Veterinaria y Zootecnia. Nunca te olvidaré.

## **Agradecimientos**

Al Dr Efrén Díaz Aparicio, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo de investigación aún sin conocerme, haberme brindado todos los recursos además de siempre estar disponible para asesorarme, un honor haber sido su alumna.

A la Dra Beatriz Arellano Reynoso, porque además de ser excelente tutora y brindarme todo su apoyo académico fue muy paciente y comprensiva conmigo. Siempre dispuesta a escuchar, la quiero mucho.

Al Dr Rigoberto Hernández Castro, por formar parte del comité tutor y siempre estar disponible cuando tenía alguna duda del proyecto.

A la Dra Gabriela Palomares Resendiz, por su asesoría en los experimentos del modelo murino y en la escritura del artículo.

Al Dr Francisco Suárez Güemes, por siempre estar al pendiente de mí y apoyarme en todo lo que necesitaba para realizar el proyecto, aun sin ser del comité tutorial.

Al técnico Pablo Pedro Vera Sánchez, por la elaboración de los reactivos y medios de cultivo para realizar los experimentos, pero sobre todo, por tu amistad, te extraño mucho.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, por haberme alegrado mi paso por el laboratorio, en especial a Anaid Maciel, Rosalía Avalos, Jorge Alva, Ángel Barragán, Adrián Muñoz, Alejandra Cortéz, así como a los Doctores José Ángel Gutiérrez Pabello, Edgar Alfonseca Silva y Alejandro Benítez Guzmán.

A la Dra Irasema Yela Miranda, qepd.

A los miembros del comité jurado, Dr Jorge Luis Tortora Pérez, Dra Mireya de la Garza Amaya, Dr Ricardo Oropeza Navarro y Dra Laura Cobos Marín, por el tiempo que me dieron en la revisión de la tesis y sus comentarios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyt) por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de doctorado. Esta investigación fue financiada por el Proyecto PAPITT IN227711.

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Justificación</b>	<b>8</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>9</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>9</b>
<b>4.1 Objetivos específicos</b>	<b>9</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>10</b>
<b>5.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo</b>	<b>10</b>
<b>5.2 Construcción de la mutante <i>aroA</i></b>	<b>10</b>
<b>5.3 Evaluación en el modelo celular</b>	<b>12</b>
<b>5.4 Evaluación en el modelo murino</b>	<b>13</b>
<b>5.4.1 Evaluación de la presentación de lesiones en el sitio de inoculación</b>	<b>13</b>
<b>5.4.2 Virulencia residual de la cepa mutante <i>aroA</i></b>	<b>14</b>
<b>5.4.3 Evaluación de la protección <i>in vivo</i> de la mutante</b>	<b>14</b>
<b>5.4.4 Respuesta inmune humoral</b>	<b>14</b>
<b>5.4.5 Medición de citocinas inducidas por la vacunación</b>	<b>15</b>
<b>5.5 Análisis estadístico</b>	<b>16</b>
<b>5.6 Protocolo para el uso de animales de laboratorio en investigación</b>	<b>17</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>18</b>
<b>6.1 Evaluación en el modelo celular</b>	<b>18</b>
<b>6.2 Evaluación en el modelo murino</b>	<b>19</b>
<b>6.2.1 Evaluación de la formación de lesiones en el sitio de inoculación</b>	<b>19</b>

<b>6.2.2 Evaluación de la virulencia residual</b>	<b>21</b>
<b>6.2.3 Evaluación de la protección <i>in vivo</i> de la mutante</b>	<b>23</b>
<b>6.2.4 Respuesta inmune humoral</b>	<b>24</b>
<b>6.2.5 Medición de citocinas inducidas por la vacunación</b>	<b>26</b>
<b>7. Discusión</b>	<b>28</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>33</b>
<b>9. Financiamiento del proyecto</b>	<b>33</b>
<b>10. Referencias.</b>	<b>33</b>

<b>LISTADO DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Mapa del gen <i>aroA</i> con 2138 pb y secuencias flanqueantes, con la enzima de restricción <i>HpaI</i> , y el gen de resistencia a kanamicina.	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b> Mapa del gen <i>aroA</i> con la inserción del gen de resistencia a kanamicina con 3360 pb.	<b>12</b>
<b>Figura 3.</b> Sobrevivencia intracelular de <i>C. pseudotuberculosis</i> en macrófagos J774A.1.	<b>18</b>
<b>Figura 4.</b> Ratón Balb/c inoculado con la cepa parental de <i>C. pseudotuberculosis</i>	<b>20</b>
<b>Figura 5.</b> Ratones Balb/c inoculados subcutáneamente con $2 \times 10^5$ UFC en 50 $\mu$ l de PBS de la cepa parental de <i>C. pseudotuberculosis</i> (a) y la cepa mutante <i>aroA</i> (b) a los 14 días post-inoculación.	<b>20</b>
<b>Figura 6.</b> Recuperación de cepas parental y <i>aroA</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> , de bazos (a) e hígados (b) de ratones inoculados por la vía subcutánea.	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de sobrevivencia de ratones Balb/c desafiados con la cepa ATCC de <i>C. pseudotuberculosis</i> por vía intraperitoneal.	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b> Respuesta inmune humoral de ratones inoculados con la cepa mutante <i>aroA</i> , a diferentes tiempos post-inoculación.	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Detección de citocinas en el sobrenadante del cultivo de linfocitos del bazo de ratones Balb/c que fueron inoculados con la cepa mutante <i>aroA</i> , comparados con un grupo control inyectado con PBS.	<b>27</b>

## Resumen

Se desarrolló la cepa mutante en el gen *aroA* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para evaluarla en los modelos celular y murino. La mutación se realizó mediante la inserción del gen de resistencia a kanamicina utilizando el plásmido pCR2.1 TOPO. Se evaluó la sobrevivencia intracelular de la cepa mutante *aroA* y la de la cepa parental de *C. pseudotuberculosis* en la línea celular de macrófagos murinos J774A.1, usando una multiplicidad de infección de 1:1 (1 bacteria y 1 célula), con tiempos de infección de 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h. La mayor diferencia en la sobrevivencia intracelular de la mutante se observó a los 30 min post-infección ( $p \leq 0.05$ ). En cuanto a la inoculación en piel por vía subcutánea, la progresión de la lesión subcutánea observada a los 14 días fue más severa en los animales inoculados con la cepa parental. Al analizar la virulencia residual en el modelo murino, no fue posible recuperar bacterias a los 28 días post-inoculación en los ratones inoculados con la cepa *aroA*. Los ratones vacunados con la mutante presentaron protección del 50% frente al desafío experimental por vía intraperitoneal, en comparación con el 41.67% del grupo control. En cuanto a la respuesta inmune humoral, las IgM sólo presentaron diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el día tres post-vacunación. Para el isotipo IgG1 se presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) a partir del día 28 y hasta el día 42. Para IgG2a sólo el día 28 mostró diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ). Se concluye que la mutante *aroA* presenta una atenuación significativa en el modelo celular y en el modelo murino, de acuerdo a los resultados de la virulencia residual en el ratón, pero no logra proteger completamente a los ratones frente al desafío experimental.

**Palabras clave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Gen *aroA*, vacunación, modelo celular, modelo murino.



## **Abstract**

An *aroA* mutant strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis* was developed in order to evaluate it in cellular and murine models. The mutation was performed by inserting a kanamycin resistance gene using the pCR2.1 TOPO plasmid. The intracellular survival of the *aroA* mutant strain and the field strain (WT) of *C. pseudotuberculosis* was evaluated in the J774A.1 murine cell line macrophage, using an infection multiplicity of 1:1 (1 bacteria and 1 cell) with the following infection times: 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h. The major difference in the intracellular survival of the mutant was observed at 30 min post-infection ( $p \leq 0.05$ ). Regarding the subcutaneous skin inoculation, the subcutaneous lesion progression observed at the 14<sup>th</sup> day was more severe in those animals that were inoculated with the WT strain. By analyzing the residual virulence in the murine model, it was not possible to recover any bacteria in mice inoculated with the *aroA* strain, at the 28<sup>th</sup> post-inoculation day. Mice vaccinated with the mutant showed a 50% protection against the intraperitoneally experimental challenge compared to the 41.67% in the control group. Regarding the humoral immune response, the IgM only showed differences on the 3<sup>rd</sup> post-vaccination day ( $p \leq 0.05$ ). For the IgG1 isotype, the difference occurred from day 28 to day 42 ( $p \leq 0.05$ ). For the IgG2a, only the 28<sup>th</sup> day showed a significant statistical difference ( $p \leq 0.05$ ). We conclude that the mutant *aroA* presents a significant attenuation in both cell and murine models, according to the results of the residual virulence in mice, but it fails to completely protect them against the experimental challenge.

**Key words:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *aroA*, vaccination, cellular model, murine model.

## 1. Introducción

En 1888, el bacteriólogo francés Edmond Isidore Nocard aisló un microorganismo inusual de un caso de linfangitis de un bovino. Tres años más tarde, en Hungría, Hugo Von Preisz aisló una bacteria similar a partir de un absceso renal en oveja, por lo cual el microorganismo fue denominado "Bacilo de Preisz y Nocard". Nocard en 1893 volvió a observar el microorganismo en el pseudomuerto equino y al año siguiente Preisz lo describió en detalle, denominándolo *Bacillus pseudotuberculosis ovis*. En 1911 Buchanan sugirió eliminar la designación de la especie, quedando entonces *Bacillus pseudotuberculosis*. Con la edición del Manual Bergey muchas de las discrepancias fueron solucionadas denominándose en 1923 como *Corynebacterium ovis*. Con la salida de la 6<sup>ta</sup> edición del Manual Bergey en 1948, el nombre oficial cambió al término actual: *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Baird y Fontaine, 2007).

La forma más característica de la enfermedad es la formación de abscesos con necrosis caseosa en linfonódulos superficiales y en tejido subcutáneo, aunque también se pueden presentar abscesos en pulmones, riñones, hígado y bazo (Menzies *et al.*, 2004). En algunas ocasiones, los signos clínicos no son evidentes, solo se observan lesiones visibles al examen post mortem, lo que dificulta el diagnóstico y el control de la enfermedad (Arsenoult *et al.*, 2003). Tiene alta incidencia, causando pérdidas por decomisos de la canal y disminución de la producción de leche y carne (Seyffert *et al.*, 2010). La linfadenitis caseosa afecta principalmente a ovinos y caprinos, en los bovinos provoca mastitis y linfangitis ulcerativa y en los equinos causa abscesos en el tejido muscular, ocasionalmente puede afectar al humano; se han publicado 33 casos de *C. pseudotuberculosis* en humanos, provoca principalmente linfadenopatía en nódulos linfáticos, neumonía, así como endocarditis (Bastos *et al.*, 2012).

La vía de entrada de la bacteria es por heridas de la piel o membranas mucosas, después la bacteria migra hacia los nódulos linfáticos superficiales regionales, para posteriormente causar abscesos caseosos con necrosis en ese lugar (McKean *et al.*, 2007). La infección es transmitida a otros animales a través del exudado purulento de los abscesos abiertos, así como de las secreciones nasales y orales (Quinn *et al.*, 1999). Es un microorganismo Gram positivo, pleomórfico que presenta una agrupación en empalizada

(Batey, 1986), pertenece al grupo de los actinomicetos que son aerobios facultativos e intracelulares facultativos (Connor *et al.*, 2000), varía en tamaño desde 0.5  $\mu\text{m}$  a 0.6  $\mu\text{m}$  y de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ , no es esporulada, no presenta cápsula, no es móvil, presenta fimbrias, es catalasa positiva y oxidasa negativa. Se encuentra dentro del grupo de los actinomicetos, que incluyen los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Paule *et al.*, 2003).

Este microorganismo crece en agar sangre o agar BHI después de 48 a 72 h de incubación a 37°C, formando colonias pequeñas blancas rodeadas por una estrecha zona de hemólisis completa, tras de varios días las colonias pasan a ser secas, friables y de color crema (Quinn *et al.*, 1999). Además, posee factores de virulencia que le permiten establecerse y permanecer en su hospedero, como es el secretar fosfolipasa D que es usada para hidrolizar las uniones de fosfato dentro de la membrana de fosfolípidos de las células del hospedero (Ghannoum, 2000). Hodgson *et al.* (1999), observaron que esta bacteria liberaba una exotoxina llamada fosfolipasa D que tiene actividad sobre la esfingomielina de las células del hospedero, fosfolípido importante que forma parte constitutiva de la pared celular y lo transforma en fosfato de ceramida y colina (Ruíz *et al.*, 2007). Cuando se realizan mutaciones por delección en el gen *pld* que codifica para esta exotoxina, la bacteria es incapaz de causar los abscesos característicos de la linfadenitis caseosa (McNamara *et al.*, 1994).

Se han reportado las actividades biológicas que tiene la fosfolipasa D en el hospedero, donde destacan la dermonecrosis, y el incremento de la permeabilidad de la membrana endotelial (Baird y Fontaine, 2007). Se ha observado que el sistema complemento por la vía alterna, en especial el fragmento C3, juega un papel importante en el reclutamiento de células inflamatorias durante el curso de la enfermedad (Bastos *et al.*, 2012). Esta exotoxina tiene actividad sobre la esfingomielina de las membranas de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos, con la consecuente formación de edema, lo que le permite colonizar y favorecer la diseminación de las lesiones a nivel regional y sistémico de los animales (Hodgson *et al.*, 1990).

Los ácidos corynomicólicos que forman parte de la pared bacteriana, contribuyen al desarrollo y a la resistencia a la acción de las enzimas hidrolíticas en el fagolisosoma, permitiendo la diseminación y la formación de abscesos (Songer, 1997), se ha observado que estos ácidos corynomicólicos favorecen que la bacteria pueda sobrevivir por largos periodos de tiempo en el medio ambiente (Williamson, 2001).

Otro factor de virulencia de *C. pseudotuberculosis* es una proteína de 40 kDa, (Lopes *et al.*, 2012; Trost *et al.*, 2010), en la que se ha observado que es uno de los principales antígenos identificados a los siete días pos-infección, anteriormente se creía que esta proteína era una serina proteasa, sin embargo, se ha observado que es una endoglicosidasa con actividad sobre sobre proteínas del huésped inmunológicamente importantes (Shadnezhad *et al.*, 2016) así como los productos de los genes del operón *fag* (*fagABCD*) que son los responsables de la adquisición de hierro extracelular, para permitir la sobrevivencia de la bacteria dentro del hospedero, aún en condiciones hostiles (Ruiz *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2014).

El diagnóstico clínico basado en la observación de los abscesos que sean sugerentes de la enfermedad, se considera suficiente para establecer la presencia de la linfadenitis caseosa a nivel individual y de rebaño.

Dentro de los diagnósticos diferenciales de la presencia de abscesos en caprinos, se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium paratuberculosis*, así como traumatismos, cuerpos extraños, las inyecciones mal aplicadas y la presencia de tumores.

Las muestras para la histopatología son de abscesos obtenidos a la necropsia y conservados en formol al 10%. En el análisis histopatológico se observa un centro amorfo y eosinófilo de necrosis rodeado por una capa de linfocitos, células plasmáticas, células epitelioides y neutrófilos, bordeado por una red de fibroblastos (Díaz *et al.*, 2015).

El primo-cultivo de exudado purulento de los abscesos se realiza en placas de agar tripticasa soya (TSA) adicionadas con sangre de bovino al 10%. Se incuban en aerobiosis a 37°C durante 48 a 72 h, y después de este tiempo se observa el tamaño de las colonias, la morfología, el pigmento y la presencia de hemólisis completa. Se realiza la tinción de Gram donde *C. pseudotuberculosis* es positiva, la morfología microscópica es característica de esta bacteria: pleomórfica con agrupación de empalizada. Posteriormente se realiza la identificación por pruebas bioquímicas como producción de catalasa y ureasa, fermentación de glucosa y sacarosa, reducción de nitratos e hidrólisis de la gelatina. Para completar la identificación se debe realizar la prueba de potencialización de la hemólisis (CAMP) descrita por (Barksdale, 1981).

Al ser *C. pseudotuberculosis* una bacteria intracelular facultativa, el inmunógeno ideal para prevenir la enfermedad sería una vacuna viva atenuada, que estimule una respuesta inmune de tipo Th1. Se han realizado diversos intentos de obtener un inmunógeno efectivo contra este padecimiento. En el modelo murino de vacunas de ADN (Afonseca *et al.*, 2008) y de proteínas recombinantes (Rodrigues – Pihno *et al.*, 2009) que, aunque son capaces de provocar una buena respuesta de anticuerpos y de algunas interleucinas, no inducen una respuesta eficaz ante el desafío con *C. pseudotuberculosis*. Las bacterinas probadas tienen efectos protectores parciales (Bastos *et al.*, 2012). Los toxoides con la fosfolipasa D no protegen contra la bacteria, pero logran una reducción del número de lesiones después de la exposición en comparación con los animales no vacunados (Moura Costa *et al.*, 2008). Se evaluó una combinación de bacterina y toxoide, con resultados parecidos a los anteriores (Piontkowski and Shiwers, 1998). También, se realizó una mutante del gen *aroQ*, y a pesar de que la aplicación subcutánea del inmunógeno en borregos redujo las lesiones, después del desafío, no resultó ser un inmunógeno adecuado (Simmons *et al.*, 1998). Los inmunógenos comerciales: bacterinas, toxoides e incluso vacunas vivas, están disponibles en varias partes del mundo desde hace tiempo, pero no han demostrado provocar una adecuada respuesta inmune (Bastos *et al.*, 2012).

El inmunógeno que logró inducir la respuesta inmune favorable al estimular la producción de IL-4 e IL-10, así como proporcionar en el modelo murino un 80% de protección al desafío intraperitoneal con una cepa virulenta, y codifica para una proteína de unión putativa para la captación de hierro (Ribeiro *et al.*, 2014). Silva *et al.*, (2014), evaluaron una cepa viva del gen a la que llamaron cp09 y codifica para fimbria y observaron que no indujo una respuesta inmune humoral, sólo mostró 50% de protección ante el desafío experimental por la vía intraperitoneal a una dosis de  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC), provocó la presencia de elevados niveles de IgG cuando la mutante fue combinada con la proteína recombinante cp40, otorgando así una protección del 70% frente al desafío experimental.

Entre los genes usados para la producción de inmunógenos, están los asociados a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, tales como el gen *aroA*. En *M. tuberculosis* se demostró la importancia que tienen en la biosíntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (Garbe *et al.*, 1991), lo que vuelve a esta bacteria incapaz de tener replicación

intracelular (Sebkova *et al.*, 2008). Se ha observado que estas mutaciones ocasionan una modificación en la regulación del gen *murA* que codifica para la síntesis de péptidoglicano, provocando a su vez defectos en la pared bacteriana y en la membrana externa de la bacteria, lo cual facilita la fagocitosis de la mutante (Sebkova *et al.*, 2008; Trebichavsky *et al.*, 2006).

La mutación en el gen *aroA* en otras bacterias tienen respuestas favorables como candidatos a vacuna, como el realizado por Alam *et al.* (2009), en donde encontraron que la mutante *aroA* de *Salmonella enterica* serovariedad Abortus equi por la vía oral e intramuscular ofrecía un 100% de protección contra la enfermedad a cobayos de cinco meses de edad; sin embargo, no se ha realizado esta mutación en *C. pseudotuberculosis*.

El gen *aroA* de *C. pseudotuberculosis* tiene un tamaño de 1,413 pb, y 471 aminoácidos, se encuentran flanqueándolo el gen *rsgA* que codifica para una GTPasa. Los aminoácidos aromáticos que se hallan directamente relacionados con este gen son la fenilalanina, el triptófano y la tirosina.

## 2. Justificación

La linfadenitis caseosa en las cabras y en los borregos es una enfermedad endémica en México, para la cual no existe más que el diagnóstico clínico que se realiza en los estados avanzados de la enfermedad. En este tiempo ya no es posible realizar tratamiento alguno, sólo se desbridan los abscesos y se les trata localmente. En las explotaciones extensivas de caprinos, generalmente no se aplican medidas sanitarias y los animales comparten potreros, aguajes con cabras de otros rebaños y en la noche al regresar al rancho, todos los animales se alojan en el mismo corral, todos estos procedimientos facilitan el contagio y la diseminación de la linfadenitis caseosa. En México, no se aplica inmunógeno alguno en las cabras para prevenir este padecimiento, en otros países se han ensayado biológicos tan sencillos como las bacterinas, y tan complicados como vacunas subcelulares usando proteínas y de ADN, así como de tipo recombinante principalmente en Brasil, Estados Unidos y Australia (Baird y Fontaine, 2007)

Para las enfermedades causadas por bacterias intracelulares facultativas, como es el caso de la linfadenitis caseosa, el inmunógeno ideal debe ser una vacuna viva; ya que como es sabido, para proteger contra las infecciones causadas por este tipo de bacterias sólo funcionan las cepas vivas no virulentas para el hospedero, que son capaces de despertar una sólida respuesta inmune de tipo humoral y sobre todo de tipo celular, que es la inmunidad eficaz contra las bacterias intracelulares. Por lo que este trabajo se enfoca en el desarrollo de una cepa mutante atenuada de *C. pseudotuberculosis*, que servirá como posible candidato a inmunógeno para prevenir la linfadenitis caseosa de los ovinos y caprinos.

### **3. Hipótesis**

La mutación en el gen *aroA* de *C. pseudotuberculosis*, permitirá que la cepa mutante pierda virulencia y confiera en el modelo murino una respuesta inmune celular y humoral capaz de resistir el desafío experimental.

### **4. Objetivo general**

Generar una cepa mutante de *C. pseudotuberculosis* en el gen *aroA* y evaluar su capacidad de conferir a ratones Balb/C una respuesta inmune humoral y celular, que les permita resistir al desafío experimental con una cepa virulenta.

#### **4.1 Objetivos específicos**

1. Desarrollar una cepa mutante en el gen *aroA* de *C. pseudotuberculosis*.
2. Evaluar la sobrevivencia y replicación intracelular de la cepa mutante en comparación con la de la cepa parental en un modelo celular de macrófagos murinos.
3. Evaluación de la atenuación de la cepa mutante en el modelo murino, determinando la virulencia residual, la respuesta inmune y la protección conferida frente al desafío experimental.



## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

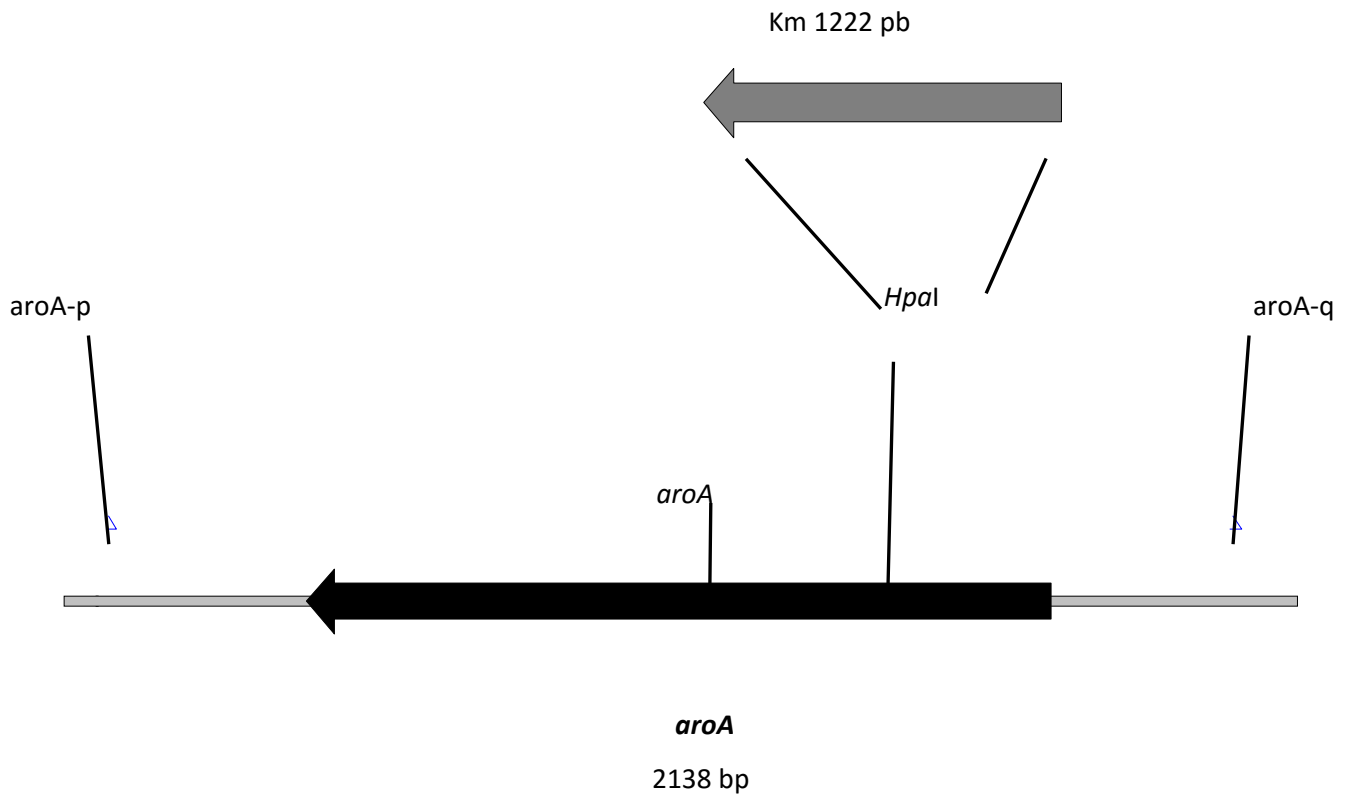
La cepa de *Escherichia coli* TOP'10 ( $F^-$  *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\phi 80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara-leu)$  7697 *galU*, *galK*, *rpsL* ( $Str^R$ ), *endA1*, *nupG*  $\lambda^-$ . Invitrogen, Carlsbad CA. USA) fue cultivada en caldo Luria Bertani (LB) (Difco, Detroit, MI. USA) con agitación orbital a 200 rpm por 16 h a 37°C (Barnstead/Lab-line Max 4000). La cepa parental de *C. pseudotuberculosis* aislada de una cabra mexicana y la cepa de referencia de *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924, fueron crecidas a 37°C en caldo tripticasa soya (TSB, Difco, Detroit, MI. USA) por 20 h o en agar tripticasa soya (TSA, Difco, Detroit, MI. USA) por 48 h (Barnstead/Lab-line Max 4000). La cepa mutante de *C. pseudotuberculosis aroA* fue cultivada bajo las mismas condiciones que la cepa de campo, adicionando 50  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina o 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (Sigma–Aldrich, USA) al medio de cultivo.

### 5.2 Construcción de la mutante *aroA*

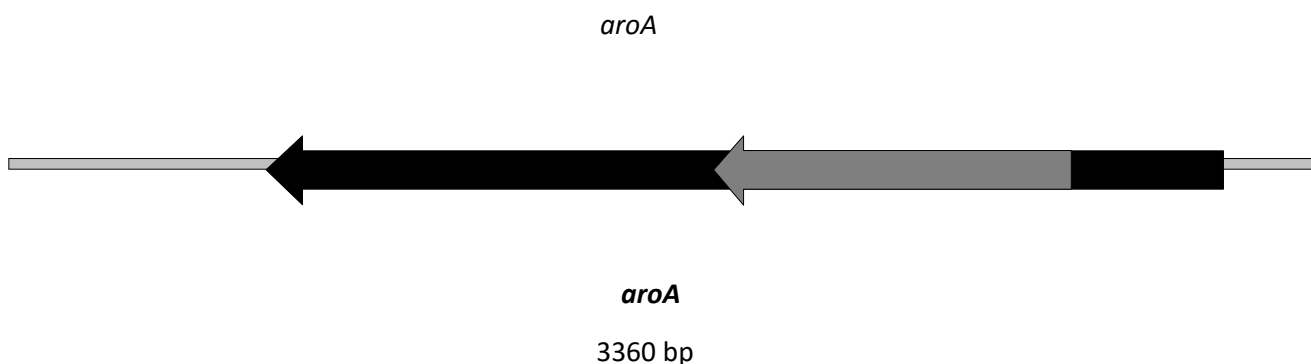
Se realizó la extracción de ADN utilizando tiocinato de guanidina (Vingataramin y Frost 2015), la amplificación del gen *aroA*, se realizó utilizando los iniciadores 5'-CCCGCTCGACAAAACCTGCA-3' y 5'-ATAACTGTTGCGCCCCGGAGTC-3' diseñados a partir de la secuencia del genoma de *C. pseudotuberculosis* (Genbank-NCBI No. de acceso NC014329), que amplifican 2138 pb e incluyen al gen completo (1413 pb) y secuencias flanqueantes.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 33 ciclos a 94°C por 45 seg, 65°C por 45 seg y 72°C por 2 min, y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. El producto de amplificación fue clonado en el plásmido pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Ventura CA. USA) (Sambrook *et al.*, 1989). El plásmido que contenía el producto amplificado fue digerido con la enzima *EcoRI* (Invitrogen, Ventura CA. USA), para verificar la clonación y fue llamado pIAaroA. El plásmido pIAaroA fue digerido con la enzima *HpaI* (Fermentas, USA), sitio único en el gen *aroA*; en este sitio se ligó el gen de resistencia a kanamicina de 1222 pb generando el plásmido pIAaroA-km (Figura 1), que fue transformado mediante electroporación a la cepa parental de *C. pseudotuberculosis* (2.5 kV,

200  $\Omega$ , 25  $\mu$ f, 200 ng de plásmido) (Dorella *et al.*, 2006). La selección de transformantes se realizó usando la resistencia a kanamicina y la sensibilidad a ampicilina en *C. pseudotuberculosis*. La mutación a nivel cromosomal se verificó por PCR utilizando los iniciadores originales (Figura 2), el producto de PCR fue purificado mediante el sistema comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, La Jolla, CA. USA) y secuenciado en ambas direcciones utilizando el sistema de secuenciación Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based y analizado en el equipo Applied Biosystems 3730 xl.



**Figura 1.** Mapa del gen *aroA* con 2138 pb y secuencias flanqueantes, con la enzima de restricción *HpaI*, y el gen de resistencia a kanamicina.



**Figura 2.** Mapa del gen *aroA* con la inserción del gen de resistencia a kanamicina con 3360 pb.

### 5.3 Evaluación en el modelo celular

Para evaluar la sobrevivencia de las cepas parental y mutante de *C. pseudotuberculosis*, se utilizó la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (Stefanska *et al.*, 2010). Las células se mantuvieron en DMEM (Invitrogen, Ventura CA. USA), con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos no esenciales y 2 mM de L-glutamina (DMEMc). Para el mantenimiento y la infección de las células, éstas se incubaron con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Los macrófagos se cultivaron en DMEM suplementado con SFB al 10% y 2 mM de L-glutamina sin antibióticos. Los macrófagos se colocaron en placas de poliestireno de 24 pozos a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup> células/ml, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 h. Cada experimento contó con dos réplicas independientes, y se repitió tres veces el ensayo de infección.

Las bacterias fueron crecidas en medio BHI durante 20 h hasta que alcanzaron la fase exponencial, con agitación orbital a 200 rpm y 37°C, previo a la infección celular fueron diluidas en DMEMc a 37°C. Los macrófagos fueron infectados a una multiplicidad de infección de 1:1 (5 x 10<sup>5</sup> bacterias por 5 x 10<sup>5</sup> macrófagos). Las placas de cultivo celular se centrifugaron a 400 x g por 5 min, y se incubaron durante 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El término de esta incubación se consideró como la hora cero de la infección, las células fueron lavadas tres veces con PBS, se les agregaron 100 µg/ml de gentamicina en una solución de DMEMc para eliminar las bacterias extracelulares y se incubaron durante 1 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, una hora después se cambió la concentración de gentamicina en el medio a 10 µg/ml

y se mantuvo durante el resto del experimento. Se determinó la sobrevivencia intracelular de las bacterias a las 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h posteriores a la hora cero de infección. La determinación del número de bacterias viables intracelulares se realizó rompiendo las células infectadas con 0.5 ml de Tritón (0.5 %)-PBS (1 X) y se estableció el número de las UFC/ml, inoculando placas de TSA, adicionadas con 50 µg/ml de kanamicina en el caso de las células infectadas con la cepa mutante *aroA*.

#### **5.4 Evaluación en el modelo murino**

Con la finalidad de determinar la presentación de las lesiones subcutáneas, de establecer la virulencia residual de la cepa mutante *aroA* y de conocer tanto la protección *in vivo* de la mutante, como la respuesta inmune, se utilizaron ratones Balb/c de 6 a 7 semanas de edad, proporcionándoles agua y alimentación *ad libitum*.

##### **5.4.1 Evaluación de la presentación de lesiones en el sitio de inoculación**

Para demostrar la atenuación *in vivo* de la mutante se realizó la evaluación del grado de lesiones en el sitio de inoculación. Se utilizaron cinco grupos de tres ratones Balb/c, un grupo fue inoculado con la cepa parental vía subcutánea en la región dorsal con  $2 \times 10^5$  UFC en 50 µl de PBS, a otro grupo se le inoculó la cepa mutante por la misma vía y la misma dosis descrita anteriormente. Los grupos tercero y cuarto fueron inoculados en el cojinete plantar con  $2 \times 10^5$  UFC en 50 µl de PBS, un grupo fue inoculado con la cepa de campo y otro grupo con la cepa mutante. Se utilizó un grupo control al cual se les inyectó PBS en el cojinete plantar y en el lomo. Los animales fueron monitoreados diariamente durante 21 días para evaluar el grado de lesión, formación de abscesos, presencia de fistulas o presencia de exudado, se sacrificaron humanitariamente el día 21 por el método de dislocación cervical; el cojinete plantar y el tejido subcutáneo de los ratones se conservaron en formol al 10% para su análisis histopatológico (Treviño-Villarreal *et al.*, 2012).

En los cortes histopatológicos se evaluó el grado de lesión ocasionada por el inóculo a diferentes tiempos. Los cortes fueron procesados por la técnica de H&E y se realizaron cortes de un grosor aproximado de 5 micras. La metodología se realizó con base en el Manual de métodos histotecnológicos del Instituto de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (1995).

#### **5.4.2 Virulencia residual de la cepa mutante *aroA***

Se utilizaron dos grupos de 27 ratones Balb/c cada uno, los animales de un grupo fueron inoculados subcutáneamente con  $2 \times 10^5$  UFC/0.1 ml de PBS de la cepa mutante *aroA*, los del otro grupo fueron inoculados por la misma vía y dosis con la cepa parental. Los animales fueron sacrificados humanitariamente por el método de dislocación cervical en número de tres por cada grupo, los días 0, 3, 6, 10, 14, 21, 28, 35 y 42 post-inoculación, de los ratones se obtuvieron el bazo y el hígado que se maceraron en 1 ml de PBS. Los órganos homogeneizados fueron diluidos 1:10 en PBS para el conteo de UFC, se inocularon por triplicado en placas de TSA o TSA con kanamicina a 50 µg/ml, incubando 48 h a 37°C.

#### **5.4.3 Evaluación de la protección *in vivo* de la mutante**

Se realizó la inmunización con la cepa mutante *aroA*, a una concentración de  $2 \times 10^5$  UFC/ml por la vía subcutánea en la región dorsal a un grupo de 24 ratones Balb/c, a un grupo control de 24 ratones se les inyectó PBS. Se realizó el desafío intraperitoneal a los 21 días post-vacunación con la cepa de *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924, a una concentración de  $1 \times 10^4$  /0.1 ml de PBS (Silva *et al.*, 2014). Los animales fueron monitoreados diariamente y al día 28 fueron sacrificados y se les realizó necropsia para realizar estudios de bacteriología en hígado y bazo.

#### **5.4.4 Respuesta inmune humoral**

Se midió utilizando un estuche comercial de ELISA indirecta, (Mouse monoclonal antibody isotyping reagent, Sigma Aldrich) para la determinación de los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM. Para lo cual se utilizaron dos grupos de 40 ratones Balb/c cada uno, los cuales se inocularon por la vía intramuscular. Un grupo se inmunizó con la mutante a una concentración de  $2 \times 10^5$  UFC/0.1 ml y al otro grupo se les inyectó PBS por la misma vía. La obtención de suero fue los días 0, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 21, 28, 35 y 42 post-inmunización. La prueba fue realizada siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizaron placas de poliestireno con fondo plano de 96 pozos (Nunc™) para realizar la prueba ELISA.

Para la preparación del antígeno, que se usó para realizar los ELISAS, se cultivó la cepa ATCC 43924 de *C. pseudotuberculosis* en caldo BHI por 48 h a 37°C a 200 rpm. Después

de este periodo, la suspensión bacteriana fue centrifugada a 960 x g por 10 min, y el sedimento fue resuspendido en 10 ml de PBS, pH 7.4, fue lavado dos veces con PBS. Las bacterias fueron sonicadas por 12 min a 60 hz en un procesador ultrasónico modelo VC marca Sonics. La masa obtenida fue centrifugada a 960 x g por 10 min, la cuantificación de proteína se realizó por el método Bradford (Nassar *et al.*, 2013). Para ser pegado a los pozos, se agregaron 100 µl de antígeno a una concentración de 4 µg/ml, diluido en bicarbonato-carbonato de sodio 0.1 M pH 9.6, las placas se incubaron durante 24 h a 37°C, se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos con PBS-T (PBS 1X, pH 7.4, 0.05 % de Tween 20). Se usó leche descremada al 1% para bloquear los sitios libres de los pozos para lo cual se incubaron 1 h a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-T. Se colocaron 100 µl por pozo de las diferentes muestras de suero diluidas 1:200 en PBS, este proceso se hizo por duplicado (Nassar *et al.*, 2013), fueron incubadas por 1 h a 37°C, se realizaron tres lavados con PBS-T. Se adicionaron 100 µl del isotipo diluido 1:1000 en PBS (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b y anti-IgM) (Sigma Aldrich). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min y se lavaron tres veces con PBS-T. Se añadieron 100 µl de anti IgG de cabra conjugada con peroxidasa (Sigma Aldrich) a una concentración de 1:5000 en PBS-T. Se incubaron las placas por 15 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T y se añadió ácido 5-aminosalicílico (Sigma Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml, se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se les agregó 50 µl de la solución de paro 3N NaOH. Las placas fueron leídas en un lector de ELISA Perkin Elmer VICTOR 3 1420 multilabel counter a una longitud de onda de 490 nm. Los resultados fueron expresados en densidades ópticas (DO).

#### **5.4.5 Medición de citocinas inducidas por la vacunación**

Con la finalidad de evaluar la inducción de citocinas producidas por la mutante se realizó la inmunización vía subcutánea de la mutante a un grupo de 40 ratones con  $2 \times 10^5$  UFC/0.1 ml y otro grupo de 40 ratones fue inoculado con PBS el día 0. Los ratones fueron sacrificados en grupo de 4 ratones por grupo y a cada ratón de cada grupo se les extrajo el bazo para el cultivo de linfocitos, días 0, 3, 5, 7, 9, 12, 14 y 21, para realizar la medición de citocinas por el método de captura de antígeno.

Los bazos de los ratones se obtuvieron bajo condiciones de esterilidad, se lavaron tres veces con solución balanceada de Hanks. Posteriormente se colocaron en una placa de

Petri conteniendo 5 ml de medio DMEM (Gibco, Invitrogen) con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Los bazos se envolvieron en una gasa estéril para retener los restos de tejido, fueron macerados y la suspensión celular fue transferida a un tubo de plástico cónico de 15 ml con 5 ml del mismo medio de cultivo celular y se centrifugó a 400 x g por 3 min. Para lisar los eritrocitos, la pastilla fue resuspendida en 1 ml de cloruro de amonio 0.17 M por cada bazo, durante 5 min a 4°C. Se realizaron tres lavados más con DMEM (Gibco, Invitrogen) con SFB al 10 % (Gibco, Invitrogen), L-glutamina (Gibco, Invitrogen) 2 mM y aminoácidos no esenciales (Gibco, Invitrogen) 0.1 mM (Ribeiro *et al.*, 2014).

Se colocaron  $5 \times 10^6$  linfocitos obtenidos de los bazos de los ratones que fueron inoculados con la cepa mutante y se hizo lo mismo con el grupo control en placas de 24 pozos. A cada pozo se le agregaron 10 µl de antígeno de *C. pseudotuberculosis* a una concentración de 50 µg/ de proteína diluido en PBS. Se utilizó un control positivo con 10 µg/ml de Pokeeweed (Invitrogen) y un control negativo con DMEM (Gibco, Invitrogen). Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes fueron colectados a las 24 h después de la inoculación y congelados a – 20°C hasta realizar la medición de citocinas *in vitro*.

Para la evaluación de la respuesta de las citocinas inducida por la cepa mutante en los ratones, a partir del sobrenadante del cultivo de linfocitos, se emplearon sistemas comerciales para la medición de citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-4 e IL-10 en ratón (Duoset ELISA; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 5.5 Análisis estadístico

El nivel de significancia fue determinado usando el análisis de mediciones repetidas de modelo mixto, para evaluar los experimentos de la mutante *aroA* en el modelo celular, virulencia residual en hígado y bazo, y la respuesta inmune. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo (Kaps and Lamberson, 2009). Para el experimento

de protección al desafío, se comparó el porcentaje de sobrevivencia entre el grupo vacunado y el grupo control después del desafío.

### **5.6 Protocolo para el uso de animales de laboratorio en investigación**

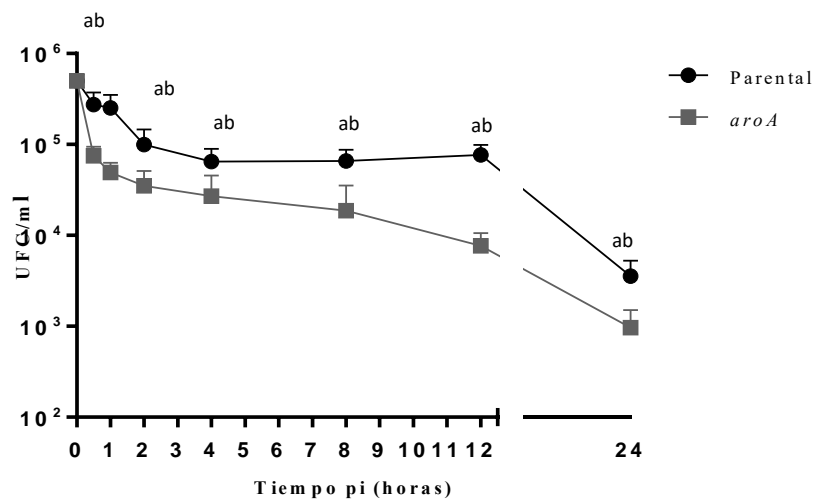
El proyecto fue aprobado por CICUAE (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) bajo la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), sobre las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.



## 6. Resultados

### 6.1 Evaluación en el modelo celular

Se realizó la infección de macrófagos J774A.1 con la cepa parental y la cepa *aroA*, se comparó la sobrevivencia intracelular a diferentes tiempos de infección. Los resultados muestran una diferencia significativa a los 30 min post-infección con  $273,333.30 \pm 40,221.61$  UFC/ml para la cepa parental y  $75,000.00 \pm 8,062.26$  UFC/ml para la cepa *aroA* ( $p \leq 0.05$ ). En los siguientes tiempos de infección se observó una disminución paulatina en el número de bacterias intracelulares a lo largo del tiempo entre ambas cepas, observándose a las 12 h una diferencia de un log entre ambas cepas y al final del experimento a las 24 h se determinaron  $3,566 \pm 691.70$  UFC/ml para la cepa WT y  $966.67 \pm 221.61$  UFC/ml (Figura 3).



**Figura 3. Sobrevivencia intracelular de *C. pseudotuberculosis* en macrófagos J774A.1.**

Los resultados son presentados como la media  $\pm$  la desviación estándar en UFC/ml a diferentes tiempos post-infección (pi). Literales diferentes (ab) indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).

## 6.2 Evaluación en el modelo murino

### 6.2.1 Evaluación de la formación de lesiones en el sitio de inoculación

Las inoculaciones de las cepas parental y la mutante *aroA* en los ratones, ocasionaron lesiones en el cojinete plantar y en el tejido subcutáneo, aunque se observó que la progresión de la lesión fue más rápida y severa en los ratones inoculados con la cepa parental en comparación con los inoculados con la cepa mutante. Desde el día tres post-inoculación se observaron lesiones muy evidentes en el cojinete plantar de los ratones inoculados con la cepa parental, llegando incluso a causar la muerte de un ratón (Figura 4). Se compararon estos resultados con los que tuvieron los ratones inoculados con la cepa mutante, que presentaron lesiones menos severas en el cojinete plantar después de siete días post-inoculación.

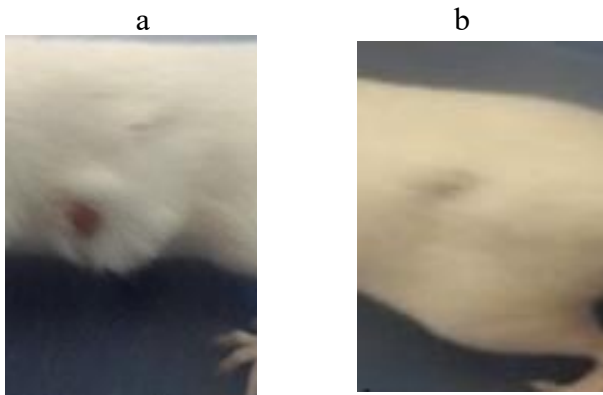
En los tres ratones inoculados con la cepa parental en tejido subcutáneo (Figura 5a), se observaron lesiones nodulares bien delimitadas de aproximadamente 1.5 cm de diámetro, con zonas de alopecia y pérdida de la continuidad, que es compatible con una úlcera, en comparación con los ratones inoculados con la cepa *aroA* (Figura 5b), en los cuales el tamaño y severidad de las lesiones fue menor.

Al ser aplicada la cepa mutante *aroA* por vía subcutánea en el dorso de los ratones, ocasionó una discreta reacción inflamatoria compuesta por linfocitos localizados en la región de la hipodermis, a nivel de dermis presentó pérdida de la continuidad celular sugestiva a edema, que comparada con la lesión causada por la cepa parental fue menor.

En los animales inoculados con la cepa parental se observó una reacción inflamatoria severa compuesta por macrófagos y linfocitos, afectando a la hipodermis y con ligera invasión a la dermis la cual también presentó pérdida de la continuidad celular sugestiva a edema.



**Figura 4. Ratón Balb/c inoculado con la cepa parental de *C. pseudotuberculosis*. Se observa un ratón inoculado con la cepa parental en cojinete plantar y encontrado muerto a los tres días pos-inoculación.**



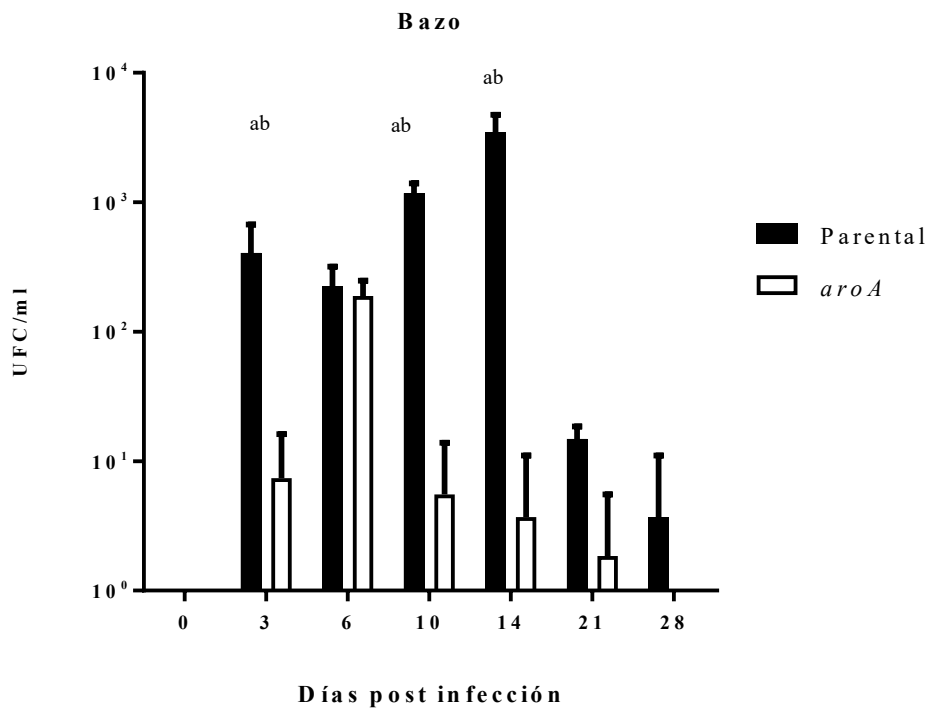
**Figura 5. Ratones Balb/c inoculados subcutáneamente con  $2 \times 10^5$  UFC en 50  $\mu$ l de PBS de la cepa parental de *C. pseudotuberculosis* (a) y la cepa mutante *aroA* (b) a los 14 días post-inoculación. A los 14 días post-inoculación se observa en el tejido subcutáneo del ratón inoculado con la cepa parental una zona bien delimitada de 1 cm con zonas de alopecia y pérdida de la continuidad compatible con una úlcera (Figura 5a). En la Figura 5b del ratón inoculado con la cepa *aroA* se observa una lesión apenas apreciable por la escasa alopecia y sin pérdida de la continuidad a nivel de epidermis.**

### 6.2.2 Evaluación de la virulencia residual

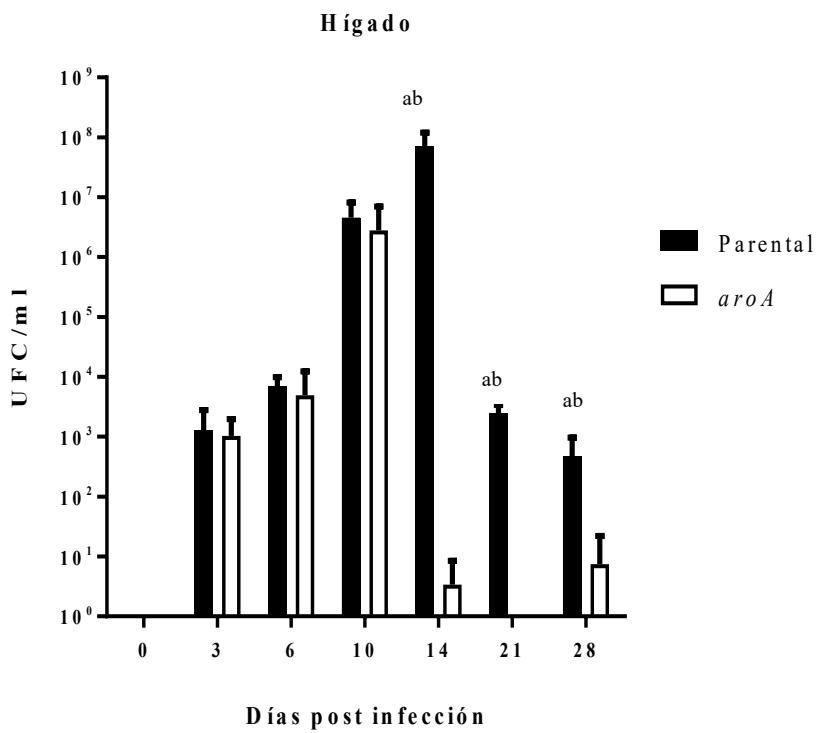
Durante el transcurso del experimento de evaluación de la virulencia residual por inoculación subcutánea de las bacterias en los ratones de ambos grupos, se observó que los animales inoculados con la cepa parental presentaron una mortalidad de 12.5% (3/24), en contraste con los ratones que se inocularon con la cepa *aroA* en los cuales no se presentó mortalidad. En cuanto al número de UFC aisladas del bazo, se observó una diferencia significativa entre los ratones inoculados con las cepas parental y la *aroA* a los días 3 ( $405.55 \pm 89.58$  UFC/ml vs  $7.41 \pm 2.93$  UFC/ml), 10 días ( $1,1175.91 \pm 74.07$  UFC/ml vs  $5.50 \pm 2.77$  UFC/ml) y 14 días ( $3,444.44$  UFC/ml  $\pm 430.56$  vs  $3.07 \pm 2.45$  UFC/ml) ( $p \leq 0.05$ ). No fue posible recuperar bacterias a los 28 días p.i. en los ratones inoculados con la cepa *aroA*, a diferencia del grupo de ratones inoculados con la cepa parental ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 6a).

En los días 3, 6 y 10 post-infección, no existió diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre el número de UFC recuperados en los hígados de los ratones, entre los ratones inoculados con la cepa parental y *aroA*. Por otro lado, la carga bacteriana de los hígados de ratones infectados con la cepa parental resultó ser significativamente mayor el día 14 con  $7.03 \times 10^7 \pm 1.63 \times 10^7$  UFC/ml comparado con  $3.70 \pm 1.69$  UFC/ml de los hígados de los ratones infectados con la cepa *aroA* ( $p \leq 0.05$ ), el día 21 los hígados de los animales infectados con la cepa parental presentaron  $2,490.74 \pm 305.70$  UFC/ml y para el caso de la cepa *aroA* no se observó ningún aislamiento, sin embargo el día 28 se presentaron  $472.22 \pm 164.94$  UFC/ml los hígados de ratones infectados con cepa parental y  $7.41 \pm 4.90$  UFC/ml los infectados con la cepa *aroA* (Figura 6b).

6a



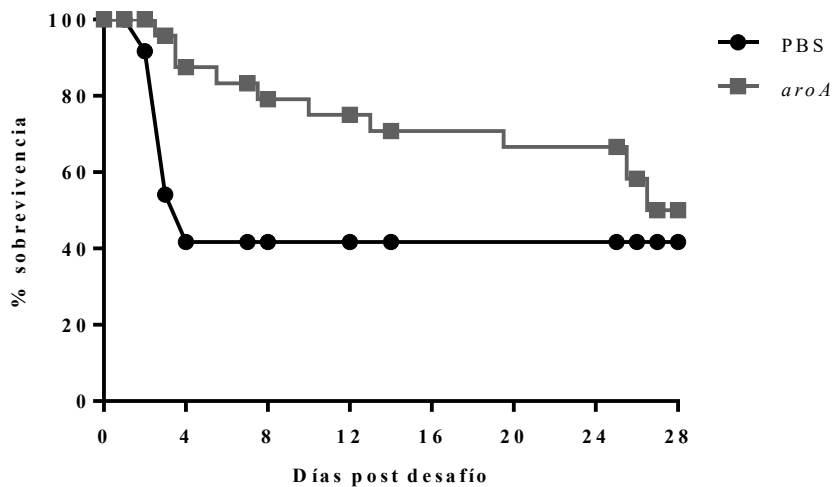
6b



**Figura 6. Recuperación de cepas parental y *aroA* de *C. pseudotuberculosis*, de bazos (a) e hígados (b) de ratones inoculados por la vía subcutánea.** Se presenta la media  $\pm$  la desviación estándar. A los 35 y 42 días no se recuperaron bacterias de la cepa parental y *aroA*. Literales diferentes (ab) indican diferencia estadísticamente significativa con una  $p \leq 0.05$ .

### **6.2.3 Evaluación de la protección *in vivo* de la mutante**

Para evaluar la capacidad de protección de la cepa mutante *aroA* ante el desafío experimental, los ratones fueron inmunizados con la cepa mutante y el grupo control fue inyectado con PBS; a los 21 días post-inmunización los ratones de ambos grupos fueron desafiados con la cepa de *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924 a una dosis de  $1 \times 10^4$ / 0.1 ml de PBS de UFC por vía intraperitoneal. Durante la primera semana post-desafío el grupo control, tuvo una sobrevivencia de 41.67% (10 de 24 animales); en contraste, el grupo vacunado con la mutante *aroA* presentó sobrevivencia del 83.33% (20/24 animales), al comparar estos grupos encontramos que existió entre ellos diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, al término del experimento los ratones inmunizados con la mutante presentaron un 50% de sobrevivencia (Figura 7), mientras que la sobrevivencia del grupo control se mantuvo en constante (41.67%).



**Figura 7. Porcentaje de supervivencia de ratones Balb/c desafiados con la cepa ATCC de *C. pseudotuberculosis* por vía intraperitoneal.** En la primera semana post-desafío, se observó una marcada diferencia de supervivencia entre el grupo control (41.67%) y el grupo vacunado con la mutante *aroA* (83.33%), ( $p < 0.05$ ), al final del experimento al día 28 presentaron 50% de supervivencia los ratones del grupo inoculados con la mutante.

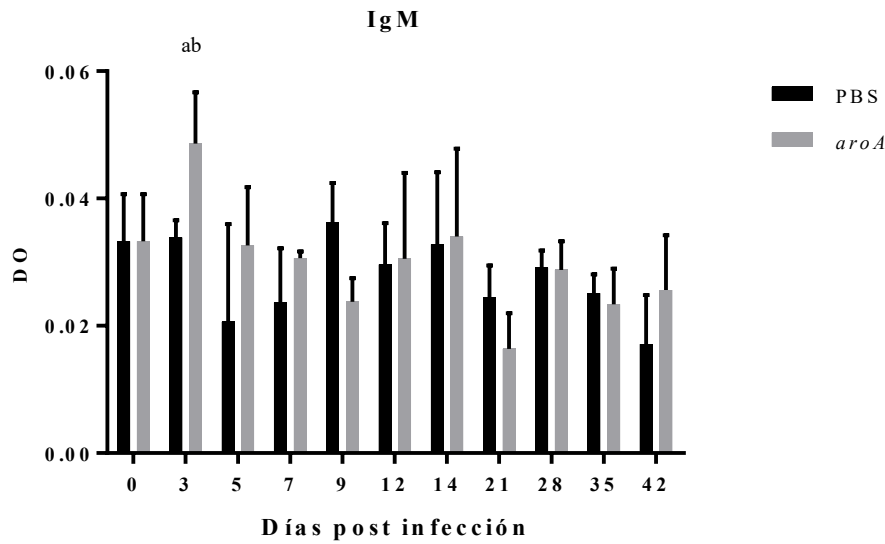
#### 6.2.4 Respuesta inmune humoral

Se evaluó la producción de anticuerpos del tipo IgM, IgG1, IgG2a e IgG2b ante la exposición a la cepa mutante *aroA*. Al medir la producción de IgM en los ratones vacunados con la cepa mutante *aroA*, a pesar de que sólo se observó aumento en la producción de anticuerpos IgM ( $p \leq 0.05$ ) en el día tres post-vacunación en relación con el grupo control (Figura 8a). Los ratones inmunizados con la cepa mutante *aroA* presentaron aumento ( $p \leq 0.05$ ) en la producción del anticuerpo IgG1 después del día 28 y hasta el día 42 posteriores a la inoculación (Figura 8b).

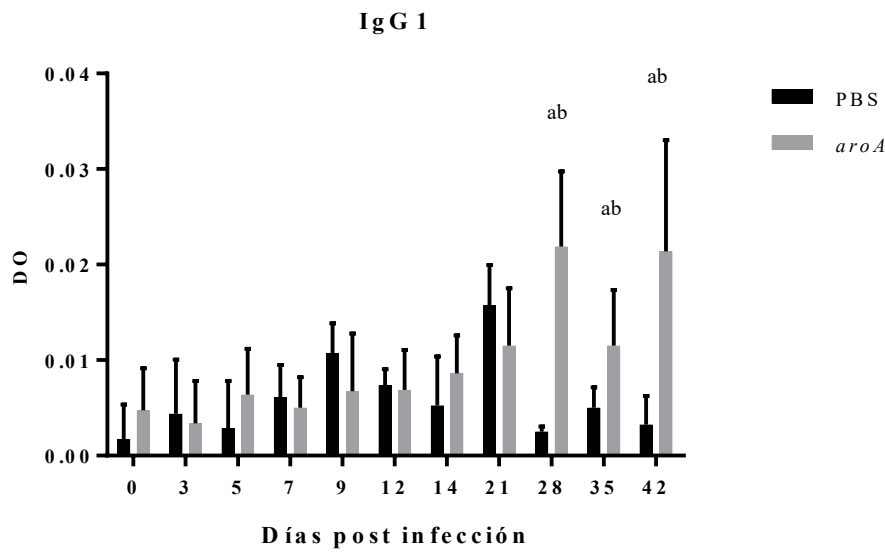
Para el isotipo IgG2a sólo en el día 28 se encontró aumento ( $p \leq 0.05$ ) entre el grupo control y el grupo vacunado (Figura 8c). Para IgG2b no hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p \geq 0.05$ ) durante todo el transcurso del experimento. Como se observa en las gráficas, los niveles de IgM que es el primer anticuerpo que se detecta para combatir una infección, son bajos para determinar que hubo una seroconversión adecuada, además hay una pobre producción de anticuerpos para una respuesta tipo Th1, que es el tipo de respuesta

inmune que nos interesa al ser una bacteria intracelular facultativa; con respecto a la respuesta de tipo Th2 no se encontraron anticuerpos que favoreciera este tipo de respuesta.

8a

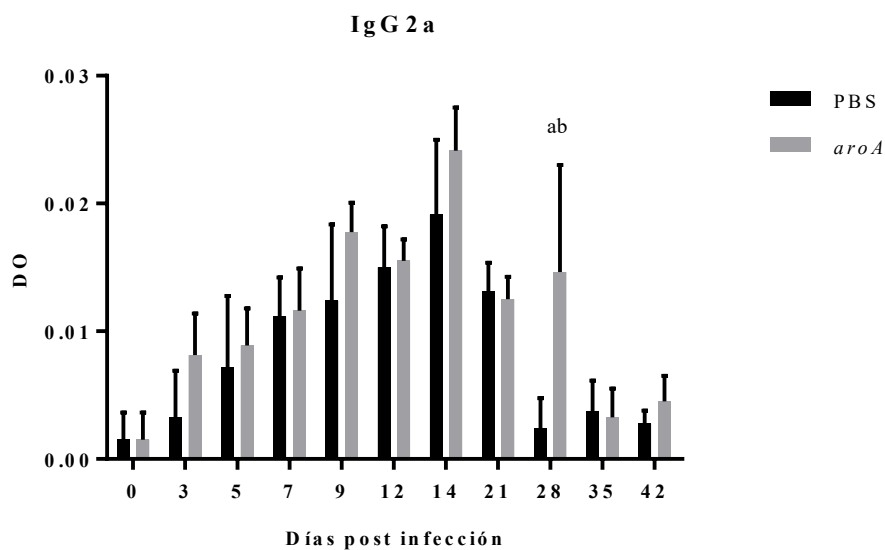


8b





8c



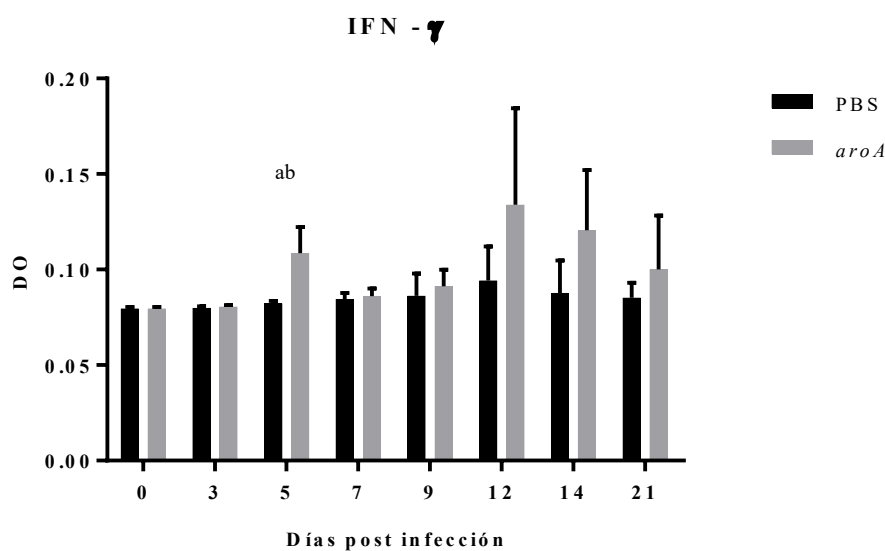
**Figura 8. Respuesta inmune humoral de ratones inoculados con la cepa mutante *aroA*, a diferentes tiempos post-inoculación.** Respuesta inmune IgM (10a), respuesta inmune IgG1 (10b), respuesta inmune IgG2 (10c). Los datos son expresados con la media  $\pm$  la desviación estándar de los sueros de 4 ratones inoculados con la cepa mutante *aroA* y un grupo control con PBS. Literales diferentes (ab) indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

### 6.2.5 Medición de citocinas inducidas por la vacunación

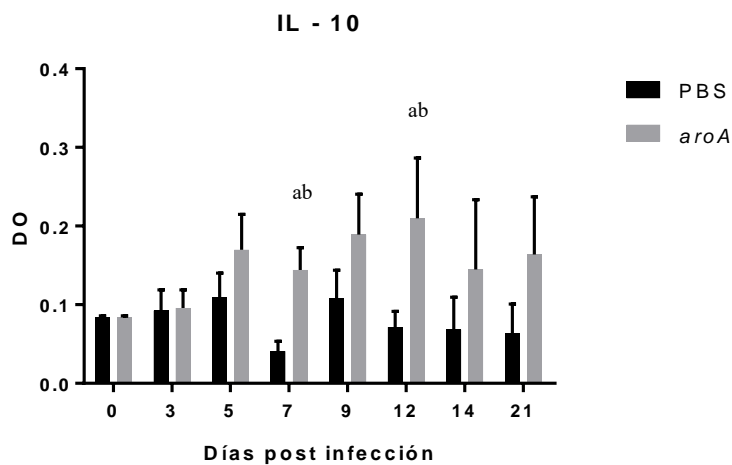
Al medir las citocinas inducidas en el modelo murino por la mutante *aroA*, se encontró que el IFN- $\gamma$  sólo mostró diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) el día 5 post-vacunación entre el grupo control y el grupo vacunado (Figura 9a), la IL-10 presentó diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) después del día siete y hasta el día 12 post-inoculación (Figura 9b). Como se observa en las figuras, hay un aumento en la producción de IL-10 después del día siete y hasta el 12 y esto ocasiona que haya una inhibición de IFN- $\gamma$ , en donde esta citosina es indispensable para que haya activación de macrófagos y es un indicativo de una respuesta inmune Th1

Al estudiar la respuesta de TNF- $\alpha$  y de IL-4 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ) durante el transcurso del experimento, lo que quiere decir que no estimula una respuesta de tipo Th1.

9a



9b



**Figura 9. Detección de citocinas en el sobrenadante del cultivo de linfocitos del bazo de ratones Balb/c que fueron inoculados con la cepa mutante *aroA*, comparados con un grupo control inyectado con PBS. Los datos representados son la media  $\pm$  la desviación estándar de cuatro ratones por grupo por día post-inoculación. Literales diferentes (ab) indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).**

## 7. Discusión

La corinebacteriosis en pequeños rumiantes es un problema ampliamente difundido en México, aunque en la mayoría de los casos no causa la muerte de los animales, las pérdidas económicas son cuantiosas. Por el momento no existe una forma eficaz de evitar, ni de prevenir el contagio de esta enfermedad, por lo que es importante investigar para producir inmunógenos que induzcan una respuesta inmune de tipo celular y prevengan de forma eficiente el contagio y la aparición de signos.

Las mutantes que se han evaluado como inmunógenos en *C. pseudotuberculosis*, no han demostrado conferir una adecuada protección a los animales susceptibles a la enfermedad (Silva *et al.*, 2014; Rodrigues-Pinho *et al.*, 2009; Hodgson *et al.*, 1999). Se han realizado inmunógenos para otras bacterias intracelulares con resultados prometedores; en este sentido en el estudio de la mutante *aroA* de *Salmonella enterica* serovariedad Abortus Equi, al ser aplicada en cobayos por las vías oral e intramuscular, otorgó protección del 100% contra el desafío experimental con la cepa virulenta (Alam *et al.*, 2009). También se han observado respuestas alentadoras al usar en aves, una mutante atenuada por delección del mismo gen en *E. coli*, administrada por vía oral e intramuscular, en las aves inmunizadas se observaron a la necropsia menores lesiones por colibacilosis comparadas con las aves no vacunadas (1.7 contra 3.5%  $p = 0.0054$ ), hubo menor porcentaje de mortalidad (9.3% contra 10.3%,  $p = 0.02$ ), la ganancia diaria de peso fue mejor en los pollos vacunados con la mutante (47.8 contra 46.2 g/día  $p = 0.0006$ ), y el número promedio de días de tratamiento de antibiótico disminuyó (0.5 contra 2.0,  $p = 0.0008$ ) (Mombargó *et al.*, 2014).

Al evaluar nuestra mutante *aroA* en el modelo celular de macrófagos murinos J774A, la diferencia observada entre las UFC recuperadas de la cepa parental comparadas con respecto de la cepa mutante *aroA*, desde los 30 min post-infección y al término del ensayo (Figura 3), puede ser atribuida a que la mutación del gen *aroA* causó regulación positiva gen *murA* el cual codifica para la síntesis del peptidoglicano, esto ocasiona defectos en la pared bacteriana, que facilitará la fagocitosis y la eliminación de la bacteria (Sebkova *et al.*, 2008).

Ribeiro *et al.* (2014) realizaron una mutante de genes que codifican para proteínas de unión putativa para el transporte de hierro y encontró que al ser deficientes en hierro y esto es indispensable para la sobrevivencia de la bacteria a nivel intracelular, la cepa mutante

presentó menor porcentaje de viabilidad bacteriana a las tres y a las seis horas en macrófagos J774A.1, lo que indica que la bacteria mutada fue fagocitada más fácilmente que la bacteria parental además de que los ratones inoculados con la cepa mutante presentaron 80% de sobrevivencia. En nuestro trabajo usando el mismo tipo de macrófagos, se encontró una menor recuperación de UFC/ml en la cepa *aroA*, sin embargo, sólo mostró una sobrevivencia del 50% en ratones Balb/c, la atenuación de nuestra mutante no fue protectora al desafío intraperitoneal.

Silva *et al.* (2014), realizaron otro ensayo de porcentaje de viabilidad bacteriana de una cepa viva del gen CP09 es la mutante de una cepa viva de *C. pseudotuberculosis* del gen que codifica para fimbria de *C. pseudotuberculosis*, determinando que la cepa mutante también tuvo menor porcentaje de viabilidad bacteriana en macrófagos murinos J774A.1 con respecto a una cepa parental de *C. pseudotuberculosis* desde la hora uno a las horas tres y seis de interacción celular; sin embargo, al igual que en nuestro trabajo, la sobrevivencia intraperitoneal al desafío experimental con una cepa parental de *C. pseudotuberculosis* fue del 50%, lo que indica que a pesar de que muestra resultados favorables en el modelo celular, en el desafío presenta baja viabilidad de los ratones

Se ha observado que una mutante *aroA* que se realizó en *Bordetella bronchiseptica*, al efectuar la infección de macrófagos J774A.1, fue menos invasiva y sobrevivió durante menor tiempo que la cepa parental, lo que es un resultado similar a lo observado en nuestro trabajo, por lo que puede afirmarse que es necesaria la presencia de este gen para la adecuada sobrevivencia y replicación de la bacteria intracelularmente (McArthur *et al.*, 2003).

Una limitante en el uso de inmunógenos para prevenir la linfadenitis caseosa, es que causan necrosis licuefactiva en el sitio de la inoculación (Baird y Fontaine, 2007). Si bien es deseable que exista cierto grado de inflamación que es indicativo de la activación de macrófagos y por lo tanto presentación de antígenos, el daño causado no debe ser extenso ni llegar hasta una necrosis. Al existir una reducción de la virulencia, las bacterias son fagocitadas eficientemente por los macrófagos y presentan componentes antigénicos de la bacteria, lo que permite el reclutamiento de células inflamatorias (Sebkova *et al.*, 2008). Aunque la aplicación de la mutante *aroA* en el cojinete plantar de los ratones, ocasionó lesiones que fueron de menor severidad que las causadas por la cepa parental, la mutante *aroA* está atenuada, pero aun así tuvo la capacidad de provocar lesiones abscedativas en el

sitio de aplicación. Este tipo de lesiones son características de los actinomicetos, pues este grupo de bacterias presentan lípidos en su pared celular que inducen inflamación y modulación en las células dendríticas y en los macrófagos (Treviño-Villarreal *et al.*, 2012). Aunque también debe tenerse en cuenta la acción de la fosfolipasa D como principal factor de virulencia causante de lesiones por daño a las membranas, no es conveniente inactivar el gen *pld* pues las mutantes que se han obtenido realizando este procedimiento resultaron en una atenuación completa, lo que derivó en falta de estimulación al sistema inmune (Afonseca *et al.*, 2008).

La reducción de la recuperación de UFC/ml en hígado y bazo de los ratones inoculados con la cepa mutante *aroA*, permite explicar que dicha cepa está siendo controlada más eficazmente por el hospedero en comparación con los ratones inoculados con la cepa parental. Resultados similares se han presentado con la mutante *aroQ* de *C. pseudotuberculosis* (Simmons *et al.*, 1998), así como con las mutantes *aroA* en *Salmonella enterica* serovariedades Enteritidis y Typhimurium (Sebkova *et al.*, 2008) y en *Listeria monocytogenes* (Stritzke *et al.*, 2004). En todos estos estudios se observó que la cepa mutante posee menor virulencia residual que la cepa parental en ratones Balb/c a los 7 y 14 días post-inoculación.

Se observó en el modelo celular la atenuación de la cepa mutante *aroA* de *C. pseudotuberculosis* en relación a la cepa parental, evidenciado por la disminución en la recuperación de UFC/ml en todos los tiempos post-infección; lo mismo se puede afirmar a partir de los resultados de virulencia residual en el modelo murino en hígado y bazo, con respecto a la disminución en la recuperación de UFC/ml a partir del día 10 post-inoculación en bazo y día 14 en hígado, sin embargo, al momento de evaluar la protección conferida por la cepa mutante frente al desafío experimental, se observó que el porcentaje de sobrevivencia del grupo vacunado al día 28 post-desafío fue de 50% (Figura 7), y que la cepa mutante no logró otorgar a los ratones la protección de por lo menos el 80% deseable en un inmunógeno por vía intraperitoneal (Ribeiro *et al.*, 2014). Lo mismo se observó en una mutante *aroA* de *Edwardsiella tarda* la que indujo una buena respuesta humoral y de factores de respuesta inmune innata, pero no logró otorgar una protección óptima frente al desafío experimental

con la cepa de campo, lo que los autores atribuyen a que esta mutante no logra inducir una adecuada respuesta de tipo celular (Mo *et al.*, 2013).

Existen varios ensayos para obtener inmunógenos contra la corinebacteriosis, se ha observado una protección del 44% con una mutante del gen *pld* de *C. pseudotuberculosis* comparado con una protección del 95% de una bacterina inactivada con formalina en borregos desafiados con *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1999). En otro trabajo donde se usó una proteína recombinante Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* que indujo respuesta inmune al aumentar las cantidades de IFN- $\gamma$  e IL-10, no logró una protección al desafiar a los ratones Balb/c con una dosis de desafío de  $1 \times 10^6$  UFC de *C. pseudotuberculosis* por vía intraperitoneal, presentando al día 11 postdesafío una mortalidad del 100%. También se han realizado ensayos con proteínas recombinantes para usarlos como inmunógenos, como es el caso de la CP40 que al aplicarlas en ratones Balb/c estimuló la respuesta inmune aumentando los niveles de IgG2a e IgG2b, después de desafiar con  $1 \times 10^4$  UFC/ml de *C. pseudotuberculosis* por vía intraperitoneal otorgó protección del 100% (Droppa- Almeida *et al.*, 2016).

En nuestro ensayo, al evaluar la respuesta inmune humoral del grupo vacunado contra un grupo control (PBS) se observó mayor cantidad de IgG1 después del día 28 post-inoculación, este tipo de respuesta está involucrada en la estimulación de la respuesta Th2 por la activación de células presentadoras de antígeno y la clonación de células B para la producción de anticuerpos neutralizantes (Dong, 2006). La aplicación de la mutante *aroA* en ratones estimuló la IL-10 después del día 7 post-vacunación e indujo una pobre respuesta celular, ya que los niveles de IFN- $\gamma$  en el grupo de ratones vacunados sólo estuvieron aumentados durante el día cinco post-vacunación, esto se relaciona con la pobre producción de IgG2a, que se asocia a su vez con la respuesta inmune de tipo Th1. El comportamiento de esta citocina fue muy similar a lo reportado por Simmons *et al.* (1998) quienes midieron la respuesta provocada en ratones Balb/c inmunizados con la mutante *aroQ* de *C. pseudotuberculosis*, encontrando que solo al día siete posterior a la inmunización los niveles de esta citocina aumentan significativamente en los animales vacunados, por lo que concluyeron que la respuesta de tipo Th1 es pobre. Conocemos que la respuesta inmune celular es importante para el control de una infección causada por bacterias intracelulares,

como es el caso de la *C. pseudotuberculosis*. La mutante *aroA* tuvo en este experimento pobre capacidad de producir una respuesta inmune Th1, se ha observado en mutaciones realizadas en cepas vivas de *C. pseudotuberculosis*, que existe una pobre adherencia de la mutante al macrófago lo cual da por resultado la reducción de la presentación de antígenos bacterianos por parte del complejo principal de histocompatibilidad tipo I porque estos antígenos no se encuentran en los niveles adecuados en los compartimentos intracelulares (Silva *et al.*, 2014).

A pesar de que la mutante *aroA* ha tenido respuestas favorables en bacterias como *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Bacillus anthracis* (Buzzola *et al.*, 2006). En *Mycobacterium tuberculosis* se ha hecho construcción de la mutante *aroA*, pero no se ha probado en modelo animal o humano, la ruta del corismato es esencial para la bacteria porque tiene relación con los aminoácidos aromáticos (Parish y Stoker, 2002), al ser *C. pseudotuberculosis* un actinomiceto, como *Mycobacterium*, también afecta la vía de producción de aminoácidos aromáticos, lo cual este gen es importante para las bacterias. Se ha observado que la mutación del gen *aroA* causa defectos en la pared celular de bacterias por lo que al momento de interrumpir la función de este gen, permite que la bacteria sea fagocitada más fácilmente por las células del hospedador (Sebkova *et al.*, 2008), sin embargo, en esta bacteria, la mutación de dicho gen, sólo protegió parcialmente a los ratones Balb/c frente al desafío experimental. Se ha observado en mutantes por delección en *Salmonella entérica* Serovar Typhimurium que provoca una buena respuesta inmunitaria y este inmunógeno puede ser usado como inmunoterapia (Felger *et al.*, 2016), también se ha observado que la mutación de éste gen afecta la vía de la ubiquinina que influye en la composición de la membrana (Sévin y Sauer, 2014).

## 8. Conclusiones

Se concluye que, a pesar de que la mutante *aroA* de *C. pseudotuberculosis*, presenta atenuación en el modelo celular en células J774A.1 y en la virulencia residual en hígado y bazo de ratones Balb/c, y que estimula pobremente la producción de anticuerpos en suero, no logra tener una adecuada respuesta celular en el modelo murino y protegió solo parcialmente a los ratones Balb/c frente al desafío experimental.

## 9. Financiamiento del proyecto

Esta investigación fue financiada por el Proyecto PAPITT IN227711. Cristina Ibarra Zazueta recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## 10. Referencias.

- Afonseca, V. D., Moraes, P. M., Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Meyer, R., Portela, R. W., Miyoshi, A., Azevedo, V. 2008. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Rech.* 7: 252 – 260.
- Alam, J., Singh, B. R., Hansda, D., Singh, V. P., Verma J. C. 2009. Evaluation of *aroA* deletion mutant of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Abortusequi* for its vaccine candidate potential. *Indian J Exp Biol.* 47: 871 – 879.
- Arsenoult, J., Girard, C., Dubreil, P., Daignault, D., Galarneau, J. R., Boisclair, J., Simard, C. Bélanger, D. 2003. Prevalence of and carcass condemnation from maedni – visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quevec, Canada. *Prev Vet Med.* 59: 67 – 81.
- Baird, G. J., Fontaine, M. C. 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* 137: 179 – 210.
- Barksdale, L., Linder, R., Sulea, I. T., Pollice, M. 1981. Phospholipase-D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the Genus *Corynebacterium*. *J. of Clinical Microbiol.* 13: 335 – 343.



- Bastos, B. L., Dias Portella, R. W., Dorella, F. A., Ribiero, D., Seyffert, N. 2012. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. J. Clin Cell Immunol. 1 – 15.
- Batey, R.G. 1986. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Aus Vet J. 63: 169 – 272.
- Connor, K. M., Quirie, M. M., Baird, G., Donachie, W. 2000. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. J. of Clinical Microbiol. 38: 2633 – 2637.
- Daniel WW. 2005. Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Cuarta Edición. Editorial Limusa Wiley. México, DF.
- Díaz A. E., Tórtora, P. J. L., Palomares, R. E. G., Gutiérrez, H. J. L. 2015. Enfermedades de las Cabras. Centro –Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Inifap. SAGARPA. México. D. F.
- Dong, C. 2006. Diversification of T – helper – cell lineages: finding the family root of IL – 17 production cells. Nat Rev Immunol. 6: 329 – 334.
- Dorella, F. A., Estevam, E. M., Cardoso, P. G., Savassi, B. M., Oliveira, S. C., Azevedo, V., Moyoshi, A. 2006a. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet Microbiol. 31: 298 – 303.
- Droppa – Almeida D., Wanessa L. P., Vivas A., Silva K, K., Rezende A, F., Simionatto S., Meyer R. Lima – Verde I., Delgostinb O, Borsuk S., Padilhaa F. 2016. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with virulent strain. Vaccine 34: 1091 – 1096.
- Felgner, S., Frahm, M., Kocijancic, D., Rohde, M., Eckweiler, D., Bielecka, A., Bueno, E., Cava, F., Abraham, W-R., Curtiss, R, III., Häussler, S, Erhardt, M., Weiss, S. 2016. aroA-deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is more than a metabolically attenuated mutant. mBio 7(5):e01220-16
- Garbe T, Servos S, Hawkins A, Dimitriadis G. 1991. *Mycobacterium tuberculosis* shikimate pathway genes: evolutionary relationship between biosynthetic and catabolic 3 – dehydroquinases. Mol. Gen. Genet. 228: 385 – 392.
- Ghannoum, M. A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clinical Microbiology. 13: 122 – 143.

- Hodgson, L. M., Kylie, C., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L. A., McColl, M., Cameron, A. 1999. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. Vaccine. 17: 802 – 808.
- Hodgson, A., Bird, P., Nisbet, I. T. 1990. Cloning nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. J. of Bacteriology. 172: 1256 – 1261.
- Kaps, M, Lamberson W. 2009. Biostatistics for animal science. An introductory text. 2<sup>nd</sup> Ed. UK, USA. CABI International.
- Lopes BB, Dias WPR, Dorella FA, Ribeiro D, Seyffert N, Castro TL, Miyoshi A, Costa OS, Meyer S and Azevedo V. 2012. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. J Clin Cell Immunol. 1 – 15.
- McArthur, J. D., West, N. P., Cole, J. N., Jungnitz, H., Guzmán C. A., Chin, J., Lehrbach, P. R., Djordjevic, S. P., Walker, M. J. 2003. An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection. FEMS Microbiol Lett. 221: 7 – 16.
- McKean, S. C., Davies, J. K., Moore, R. J. 2007. Expression of phospholipase D, major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. Microbiology. 153: 2203 – 2211.
- McNamara, P. J. 1994. Attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by targeted mutagenesis of the phospholipase D gene.
- Moura-Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Vale, V. L., Paule, B. J. 2008. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. Vet Immunol Immunopathol 126:131-141.
- Mo, Z, L., Li, J., Li, G. Y., Xiao, P. 2013. Phenotypic characterization, virulence and immunogenicity of *Edwardsiella tarda* LSE40 aroA mutant. Ppl Microbiol Biotechnol. 97\_ 6325 – 6353.

- Mombark M., Bouzoubaa K., Andrews S., Vanimisetti H. B., Rodenberg J., Karaca K. 2014. Safety and efficacy of an aro-deleted live vaccine avian colibacillosis in a multicenter field trial in broiler in Morocco. *Avian Pathol.* 43: 276 – 281.
- Nassar, C. F. A., Miyashiro, S., Gregon, F., Piatti, R. M., Daniel, G. T., Gregory, L. 2013. Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Small Ruminant Research.* 116: 229 – 232.
- Paule, B. J., Azevedo, V., Regis, L. F., Carminati, R., Bahia, C. R., Vale, V. L., Moura – Costa, L. f., Freire, S. M. Nascimento, I., Schaer, r., Goes, A. M., Meyer, R. 2003. *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- gamma production, IgD avidity and antigen recognition by western blotting. *Vet Immunol Immunopathol.* 96: 129 – 139.
- Parish, T., Stoker, N. G. 2002. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 148: 3069 – 3077.
- Piontkowski, M. D., Shivvers, D. W. 1998. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J Am Vet Med Assoc* 212: 1765-1768.
- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B., Carter, G. R. 1999. *Clinical Veterinary Microbiology.* Ed Mosby. Virginia, USA.
- Ribeiro, D., Souza, R. F., Morais, C. L., de Castro, S. S., Silva, A., Dias, P. R., Miyoshi, A., Costa, O. S., Azevedo, V. 2014. An iron – acquisition - deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. *Vet. Res.* 1186 – 1297.
- Rodrigues – Pinho, J. M., Alves – Dorella, F. A., da Silva – Coelho, K., Toscano – Fonseca, C., Caldas – Cardoso, F., Meyer, R. 2009. Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* heat – shock protein (Hsp)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. *The open Vet Sci.* 3: 22 – 27.
- Ruiz LJ, Barreta VM y Frias MT. 2007. Linfadenitis caseosa I: aspectos históricos, etiológicos y clínicos. Vol 8. Agosto 2007. <http://www.veterinaria.org/recvet>.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. Laboratory manual. 2da. edition. Cold spring Harbor laboratory press.
- Sebkova, A., Kasarova, D. Crhanova, M., Budunska, E., Rychlik, I. 2008. Aro mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cellular wall and outer membrane integrity. J of Bacteriology. 190: 3155 – 3160.
- Sévin, D. C., Sauer, U. 2014. Ubiquinone accumulation improves osmotic stress tolerance in *Escherichia coli*. Nat Chem Biol 10:266 –272
- Seyffert, N., Guimarães, A. S., Pacheco, L. G., Portela, R. W., Bastos, B. L., Dorella, F. A., Heinemann, M. B., Lage, A. P., Gouveia, A. M., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, V. 2010. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res Vet Sci. 88: 50 – 55.
- Shadnezhad, A., Naegeli, A., Collin, M. 2016. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. BMC Microbiol. 8;16(1):261.
- Silva, J. W., Droppa-Almeida, D., Borsuk, S., Azevedo, V., Portella, R. W., Miyoshi, A., Rocha, F. S., Dorella, F. A., Vivas, W. L., Padiha, F. F., Hernández-Macedo, M. L., Lima-Verde, I. B. 2014. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. BMC Vet Res. 10: 965.
- Simmons, C. P., Dunstan, S. J., Tachedjian, M., Krywult, J., Hodgson, A. L., Strugnell, R. A. 1998. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. Infect Immun. 66: 474 – 479.
- Songer, J. G. 1997. Bacteria phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol, 5:156 – 161.
- Stefanska, I., Gierynska Rzewuska, M., Binek, M. 2010. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. Polish J of Vet Sci. 13: 143 – 149.
- Stritzker, j., Janda, J., Schoen, C., Tauup, M., Pilgrim, s., Gentshev, I., Schreier, P., Geginat, G., Goebel, W. 2004. Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes aro* mutants. Infect Immun. 72: 5622 – 5629.

- Trebichavsky, I. A., Splichalova, I., Rychilik, H., Hojna, Y., Muneta, Y., Splichal, I. 2006. Attenuated *aroA* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium does not induce inflammatory response and early protection of gnotobiotics pigs against parental virulent LT2 strain. *Vaccine* 285 – 289.
- Treviño – Villareal, J. H., Vera – Cabrera, L., Valero – Guillen, L., Salinas – Carmona, C. 2012. *Nocardia brasiliensis* cell wall lipids modulate macrophage and dendritic responses that favor development of experimental actinomycetoma in Blab/c mice. *Infect Immun.* 80: 3587 – 3601.
- Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schröder, J., Jaenicke, S., Goesmann, A., Husemann, P., Stoye, J., Dorella, F. A., Souza, R. F., Soares, S. C, Afonseca, V., Miyoshi, A., Ruiz, J., Silva, A., Azevedo, V., Burkovski, A., Guiso, N., Join – Lamberto, O. F., Kayal, S., Tauch, A. 2010. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene regulatory networks contributing to virulence. *Genomis.* 11: 728.
- Vingataramin L. Frost EH. 2015. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *Biotechniques.* 58: 120-125.
- Williamson, L. H. 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary clinics of North America. Food animal practice.* 17: 359 – 371.