

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIENCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“IMPORTÂNCIA DO FLAGELO PARA A PATOGENICIDADE  
DE *SALMONELLA ENTERICA* SUBESPÉCIE *ENTERICA*  
SOROVAR GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM”**

**Oliveiro Caetano de Freitas Neto**  
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“IMPORTÂNCIA DO FLAGELO PARA A PATOGENICIDADE  
DE *SALMONELLA ENTERICA* SUBESPÉCIE *ENTERICA*  
SOROVAR *GALLINARUM* BIOVAR *GALLINARUM*”**

**Oliveiro Caetano de Freitas Neto**

**Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior**

**Co-orientador: Prof. Dr. Paul Barrow**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

F866i Freitas Neto, Oliveira Caetano  
Importância do flagelo para a patogenicidade de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum / Oliveira Caetano de Freitas Neto. -- Jaboticabal, 2012  
xiv, 111 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Co-orientador: Paul Barrow

Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Raphael Lúcio Andreatti filho, Fabiana Horn, Guilherme Correa de Oliveira

Bibliografia

1. Aves de postura. 2. Colonização do ceco. 3. citocinas. 4. *Salmonella* Gallinarum. 5. TLR-5. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988.73:636.5



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** IMPORTÂNCIA DO FLAGELO PARA A PATOGENICIDADE DE *Salmonella enterica*  
SUBESPÉCIE *Enterica* SOROVAR GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM

**AUTOR:** OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR


**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. PAUL BARROW

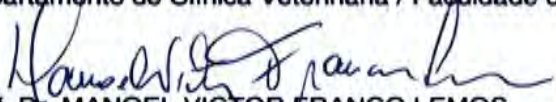
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA  
VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR  
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de  
Jaboticabal

  
Prof. Dr. GUILHERME CORREA DE OLIVEIRA  
Centro de Excelência em Bioinformática / FIOCRUZ / Belo Horizonte/MG

  
Profa. Dra. FABIANA HORN  
Departamento de Biofísica / Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Porto Alegre/RS

  
Prof. Dr. RAPHAEL LÚCIO ANDREATTI FILHO  
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

  
Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
de Jaboticabal

Data da realização: 23 de fevereiro de 2012.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO** – Nascido em 31 de janeiro de 1982, natural de Uberaba, Minas Gerais, formou-se em Medicina Veterinária em janeiro do ano de 2006, pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP/Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica em duas ocasiões, tendo desenvolvido projetos de pesquisa nas áreas de nutrição e patologia aviária. Ingressou no mestrado em março de 2006, na FCAV/UNESP/Jaboticabal no programa de Medicina Veterinária na área de Patologia Animal, com ênfase em ornitopatologia e Salmoneloses aviárias. Em março de 2008, iniciou o curso de doutorado pelo mesmo programa, sendo que de março de 2009 a dezembro de 2010 realizou atividades de pesquisa, referentes ao estágio de doutorado no exterior, na Escola de Medicina Veterinária da Universidade de Nottingham do Reino Unido.

....."Que eu não perca o OTIMISMO, mesmo sabendo que o futuro que nos espera não é  
assim tão alegre.

Que eu não perca a VONTADE DE VIVER, mesmo sabendo que a vida é, em muitos  
momentos, dolorosa...

Que eu não perca a vontade de TER GRANDES AMIGOS, mesmo sabendo que com as voltas  
do mundo, eles acabam indo embora de nossas vidas...

Que eu não perca a vontade de AJUDAR AS PESSOAS, mesmo sabendo que muitas delas são  
incapazes de ver, reconhecer e retribuir esta ajuda.

Que eu não perca o EQUILÍBRIO, mesmo sabendo que inúmeras forças querem que eu  
caia.....

Que eu não perca a LUZ e o BRILHO NO OLHAR, mesmo sabendo que muitas coisas que  
verei no mundo, escurecerão meus olhos...

Que eu não perca a GARRA, mesmo sabendo que a derrota e a perda são dois adversários  
extremamente perigosos...

Que eu não perca a RAZÃO, mesmo sabendo que as tentações da vida são inúmeras e  
deliciosas.

Que eu não perca o SENTIMENTO DE JUSTIÇA, mesmo sabendo que o prejudicado possa ser  
eu.....

Que eu não perca a BELEZA E A ALEGRIA DE VER, mesmo sabendo que muitas lágrimas  
brotarão dos meus olhos e escorrerão por minha alma...

Que eu não perca o AMOR POR MINHA FAMÍLIA, mesmo sabendo que ela muitas vezes me  
exigiria esforços incríveis para manter a sua harmonia.

Que eu não perca a vontade de SER GRANDE, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...  
E acima de tudo... Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente,  
que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e  
transformar qualquer coisa, pois.... A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E  
CONCRETIZADA NO AMOR"....

**Francisco Cândido Xavier**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha avó Maria Tereza, à minha mãe Ana e à minha irmã Camila por me ajudarem a superar os desafios e seguir adiante.

## **AGRADECIMENTOS**

Deus por permitir que eu tenha saúde e capacidade de aprender as lições acadêmicas bem como as de vida e conseguir trilhar o meu caminho.

À faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Patologia Veterinária pelo aprendizado.

À escola de Medicina Veterinária da Universidade de Nottingham, pelo aprendizado.

Ao Professor Ângelo Berchieri pela amizade, por confiar em meu trabalho e me oferecer a oportunidade de sua orientação, transferindo-me ensinamentos acadêmicos e lições da vida.

Ao Professor Paul Barrow por me receber em seu laboratório, oferecendo-me ensinamentos, amizade e por ser o entusiasta de muitos de meus anseios científicos.

Ao amigo Ariel Irme pela transferência de sua experiência e conhecimento em biologia molecular.

À Adriana Maria de Almeida pelo auxílio e dedicação durante as atividades desenvolvidas no laboratório de ornitopatologia.

À Margaret Lowell pela paciência e ensinamentos durante meu estágio no exterior.

Aos colegas do Brasil e exterior, Rafael, Henrique, Diego, Priscila, Janine, Bruno, Bruna, Miguel, Lucas, André Santana, Luis Fernando, Bernardo, Carlos Eduardo, Guilherme, Antônio, Carlos Eduardo, Felipe, Agnes, Ahmed Setta, Abdul, Elazoomi, Piotr, Kunal pelo companheirismo e amizade.

À FAPESP, CAPES e à Reitoria da UNESP pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

	Página
. LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
I INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Taxonomia e nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i> .....	3
2.2 Patogenia das salmoneloses aviárias.....	4
2.3 Considerações sobre o genoma de <i>Salmonella</i> spp.....	9
2.4 Estrutura, funcionamento e regulação gênica do flagelo em <i>Salmonella</i> spp.....	11
2.5 Flagelina e interação com receptores do hospedeiro.....	18
III. OBJETIVOS.....	21
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Comparação e análise das sequências gênicas.....	23
4.2 Bactérias.....	23
4.3 Preparo dos mutantes.....	23
4.3.1 Escolha da sequência alvo, desenho dos iniciadores, amplificação dos fragmentos de DNA recombinante e eletroporação.....	26
4.3.2 Transdução.....	30
4.3.3 Verificação da mutação nas estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	31
4.4 Detecção de motilidade nas estirpes SG, SE, SG Fla+, SE $\Delta$ fliC e SE $\Delta$ fliJ.....	33
4.5 Verificação da presença de flagelos nas estirpes SG, SE, SG Fla+, SE $\Delta$ fliC e SE $\Delta$ fliJ.....	33
4.6 Quantificação da expressão do gene <i>fliC</i> <i>in vitro</i> em várias estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	34
4.7 Infecção de células com estirpes de <i>Salmonella</i> spp. e	

	quantificação da expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune .....	36
4.7.1	Padrão de multiplicação das estirpes.....	36
4.7.2	Células de rins de galinhas (CRG).....	37
4.7.3	Macrófagos de galinhas (linhagem HD11).....	37
4.7.4	Infecção das células e contagem intracelular das estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	37
4.7.5	Quantificação da expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune em células de cultivo após infecção por estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	38
4.7.5.1	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	38
4.7.5.2	Quantificação da expressão gênica.....	39
4.8	Ensaio <i>in vivo</i> . Avaliação da patogenicidade.....	42
4.8.1	Aves.....	42
4.8.2	Delineamento experimental.....	42
4.8.3	Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade, alterações macroscópicas e pesquisa das estirpes em fígado, baço e conteúdo cecal.....	43
4.9	Análise dos resultados.....	43
V.	RESULTADOS.....	43
5.1	Análise das seqüências dos genes envolvidos na produção do flagelo em SG e SE.....	44
5.2	Verificação da mutação nas estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	45
5.3	Verificação de motilidade nas estirpes SG, SE, SG Fla+, SE $\Delta$ fliC e SE $\Delta$ fliJ.....	53
5.4	Verificação da presença de flagelos nas estirpes SG, SE, SG	

	Fla+, SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta fliJ$ .....	55
5.5	Expressão do gene <i>fliC</i> <i>in vitro</i> em várias estirpes de <i>Salmonella</i> spp.....	58
5.6	Quantificação bacteriana intracelular e da expressão de gênica celular.....	60
5.6.1	Contagem das estirpes <i>Salmonella</i> spp. no interior células de rins de galinhas (CRGs).....	60
5.6.2	Contagem das estirpes de <i>Salmonella</i> spp. no interior de macrófagos de aves (HD 11).....	61
5.6.3	Expressão de iNOS, CXCLi1, CXCLi2, IL-6 e TLR-5 em células epiteliais de rins de galinhas (CRGs).....	63
5.6.4	Expressão dos genes responsáveis por mediadores da resposta imune em macrófagos de galinhas (HD 11).....	65
5.7	Ensaio <i>in vivo</i> . Avaliação da patogenia.....	70
VI.	DISCUSSÃO.....	75
VII.	CONCLUSÕES.....	81
VIII.	REFERÊNCIAS.....	82
	APÊNDICE	
1	Exemplo de cálculo do peso molecular de <i>amplicons</i> das estirpes de <i>Salmonella</i> spp. para confirmação da mutação.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CBG:</b>	Estrutura do corpo basal e do gancho do flagelo
<b>cDNA:</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CDS:</b>	Sequência codificadora específica
<b>Cf<sup>r</sup>:</b>	Resistência ao cloranfenicol
<b>CRGs:</b>	Células de rins de pintainhos
<b>CXCLi1</b>	
<b>(ou K60):</b>	CXC - quimiocina ligante um
<b>CXCLi2</b>	
<b>(ou IL-8):</b>	CXC - Quimiocina ligante dois
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DO:</b>	Densidade óptica
<b>IgA:</b>	Imunoglobulina A
<b>IgM:</b>	Imunoglobulina M
<b>IL-1<math>\beta</math>:</b>	Interleucina um beta
<b>IL-2:</b>	Interleucina dois
<b>IL-4:</b>	Interleucina quatro
<b>IL-10:</b>	Interleucina dez

<b>IL-13:</b>	Interleucina treze
<b>IL-18:</b>	Interleucina dezoito
<b>INF-<math>\gamma</math>:</b>	<i>interferon gama</i>
<b>iNOS</b>	
<b>(CCLi2):</b>	Oxido nítrico sintase induzível ou CC - quimiocina ligante dois
<b>Kn<sup>r</sup>:</b>	Resistência a canamicina
<b>LITAF:</b>	Fator de necrose tumoral alfa induzido por lipopolissacarídeo
<b>LPS:</b>	Lipopolissacarídeos
<b>MHC:</b>	Complexo de histocompatibilidade maior
<b>Nal:</b>	Ácido nalidíxico
<b>NLRs:</b>	Receptores do tipo <i>nod</i>
<b>Nov:</b>	Novobiocina
<b>PAMPs:</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>PBS:</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PCR:</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucléico
<b>SG:</b>	<i>Salmonella Gallinarum</i>
<b>SG Fla+:</b>	Estirpe mutante de <i>Salmonella Gallinarum</i> capaz de produzir flagelos
<b>SE:</b>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
<b>SE <math>\Delta</math>fliC:</b>	Estirpe mutante de <i>Salmonella Enteritidis</i> com o gene <i>fliC</i> defectivo

<b>SE <math>\Delta</math>fliJ:</b>	Estirpe mutante de <i>Salmonella</i> Enteritidis com o gene <i>fliJ</i> defectivo
<b>SN:</b>	Caldo selenito acrescido de novobiocina
<b>SP:</b>	<i>Salmonella</i> Pullorum
<b>SPF</b>	<i>Specific pathogen free</i>
<b>SPI-1:</b>	Ilha de patogenicidade de número um
<b>SPI-2:</b>	Ilha de patogenicidade de numero dois
<b>SSTT:</b>	Sistema de secreção do tipo três
<b>ST:</b>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<b>Taq:</b>	Enzima taq polimerase
<b>Th1:</b>	Resposta do tipo T auxiliar um
<b>Th2:</b>	Resposta do tipo T auxiliar dois
<b>TLR-4:</b>	Receptores do tipo <i>toll</i> de número quatro
<b>TLR-5:</b>	Receptores do tipo <i>toll</i> de número cinco
<b>UFC:</b>	Unidades formadoras de colônias
<b>VB:</b>	Ágar verde-brilhante
<b>VBNalNov:</b>	Ágar verde-brilhante acrescido de ácido nalidíxico e novobiocina

**IMPORTÂNCIA DO FLAGELO PARA A PATOGENICIDADE DE *SALMONELLA*  
*ENTERICA* SUBESPÉCIE *ENTERICA* SOROVAR *GALLINARUM* BIOVAR  
*GALLINARUM***

**RESUMO** - *S. Gallinarum* (SG) provoca o tifo aviário, doença sistêmica com alta mortalidade em aves. Esse biovar é imóvel devido à falta de flagelos. Foi sugerido que a ausência de flagelo resultaria na indução de resposta pró-inflamatória de menor intensidade na mucosa intestinal, favorecendo o desenvolvimento da infecção sistêmica. Para investigar essa hipótese, um mutante de SG capaz de produzir flagelos (SG Fla+) foi construído. Analisou-se a capacidade deste mutante de invadir células epiteliais renais (CRGs), sobreviver em macrófagos da linhagem HD 11 e induzir a expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune nestas células, em conjunto com outras estirpes de *Salmonella* spp. Aliado a isso, comparou-se a patogenicidade de SG Fla+ e SG para aves de uma linhagem para postura comercial, avaliando-se a mortalidade e as alterações macroscópicas. Os resultados demonstraram que o flagelo aumentou a capacidade de invasão das estirpes para CRGs, mas não alterou a sobrevivência de SG Fla+ no interior dos macrófagos HD 11. SG Fla+ induziu a maior aumento da expressão de CXCLi2, IL-6 e de iNOS em CRGs que as estirpes sem flagelos ( $p < 0,05$ ). A expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune em macrófagos HD11 não esteve ligada a presença de flagelo. SG Fla+ provocou menores taxas de mortalidade que SG ( $p < 0,05$ ). Após 28 dias do desafio, SG Fla+ foi isolada no conteúdo de alguns cecos com alterações sugestivas de inflamação.

**Palavras chave:** Aves de postura, colonização do ceco, citocinas, flagelo, *Salmonella Gallinarum*, TLR-5

## **ROLE OF FLAGELLUM IN THE PATHOGENICITY OF *SALMONELLA ENTERICA* SUBESPECIE *ENTERICA* SOROVAR *GALLINARUM* BIOVAR *GALLINARUM***

**SUMMARY** - *S. Gallinarum* (SG) is the causative agent of fowl typhoid, a systemic disease responsible for high mortality rates in birds. This biovar is non-motile due to the lack of flagella. It has been proposed that the absence of flagellum would provoke less pro-inflammatory immune response in the gut, favoring the development of systemic infection. In order to investigate this, a SG mutant strain capable of producing flagella (SG Fla+) was constructed. The capability of this mutant and other *Salmonella* spp. strains in invading chicken kidney cells (CKCs), surviving in HD 11 macrophages and inducing inflammatory responses in these cells were assessed. In addition, the pathogenicity of SG Fla+ and SG was comparatively assessed in commercial laying hens. Mortality rates and gross lesions were evaluated. The results shown that flagellum increased the invasiveness of strains to CKCs while its presence did not change the survival of SG Fla+ in HD11 macrophages. SG Fla+ induced higher levels of CXCLi2, IL-6 and iNOS gene expression than non-flagellated strains did ( $p<0.05$ ). The expression of genes responsible for mediators of immune responses in infected HD11 macrophages were not related to the presence of flagella. SG Fla+ caused lower mortality rates than SG ( $p<0.05$ ). SG Fla+ was recovered from the contents of caeca which presented inflammation-like macroscopic alterations not observed in birds infected with SG.

**Keywords:** Caecal colonization, laying hens, cytokines, flagella, *Salmonella Gallinarum*,TLR-5



## I. INTRODUÇÃO

As salmoneloses aviárias são enfermidades provocadas por bactérias Gram-negativas, pertencentes ao gênero *Salmonella*, descritas há mais de um século. Mesmo sendo estudadas e conhecidas há vários anos, ainda causam prejuízos econômicos para o setor avícola, em várias regiões do mundo. Além das perdas provocadas por mortalidade, piora de índices zootécnicos, eutanásia de plantéis avícolas, gastos com medicamentos e vacinas, as salmoneloses geram restrições para o comércio internacional de produtos alimentícios (PLYM-FORSHELL & WIERUP, 2006), pois podem provocar infecção alimentar em seres humanos (CDC, 2007; CDC, 2010).

Algumas bactérias do gênero *Salmonella* infectam as aves, podendo causar três enfermidades distintas. A pulorose, causada por *S. Pullorum*, o tifo aviário, provocado por *S. Gallinarum* e o paratifo aviário, causado por qualquer outro que não seja *S. Pullorum* ou *S. Gallinarum*. Cerca de 90 dessas bactérias são as mais envolvidas em casos de infecção de seres humanos e animais. Dentre estas, algumas podem infectar as aves, causando ou não o paratifo aviário e, por meio de produtos alimentícios de origem avícola, estarem associados a casos de infecção alimentar em humanos.

*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são genotipicamente semelhantes e possuem os mesmos antígenos somáticos. Ao contrário de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* tem flagelos e por isso é móvel. Apesar de possuírem características em comum, essas três bactérias causam enfermidades distintas.

*S. Gallinarum* é responsável pelo tifo aviário, uma infecção septicêmica grave, com alta morbidade e mortalidade em aves de qualquer idade, com pouco ou nenhum comprometimento intestinal, sendo transmitida horizontalmente. *S. Pullorum*, por sua

vez, causa septicemia, quadro de diarreia branca, alta mortalidade e morbidade em aves infectadas nos primeiros dias de vida, com transmissão pelas vias vertical e horizontal, podendo ainda provocar infecção persistente em algumas aves que se recuperam. Quando *S. Enteritidis* infecta aves jovens, pode causar uma doença que se assemelha à pulorose, mas com inflamação da parede do intestino, intensa colonização intestinal e elevada excreção fecal.

*S. Pullorum* e *S. Gallinarum* são algumas das poucas bactérias do gênero *Salmonella* que não possuem flagelos. A importância dessa característica fenotípica no desencadeamento das salmoneloses foi pouco estudada. Tem sido sugerido que a ausência de flagelo resultaria na indução de uma resposta imune inata de menor intensidade na mucosa intestinal, favorecendo o desenvolvimento de uma infecção sistêmica. Nas infecções por sorovares com flagelos, como *S. Enteritidis*, a presença dessa organela induziria a rápida e forte resposta imune na mucosa intestinal, diminuindo a intensidade da infecção sistêmica.

Recentemente, receptores do tipo *toll* de número cinco (TLR-5) foram identificados na membrana de células do epitélio intestinal e nas populações de células do sistema imune de galinhas. A flagelina (monômero proteico que compõe o filamento do flagelo) é a proteína com propriedade de ativar os TLR-5. Uma vez estimulados, os TLR-5 desencadeiam a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, as quais são responsáveis pela ativação do sistema imune inato e adaptativo. Diante do exposto, foi sugerida a hipótese de que o flagelo poderia estar associado à patogenia das salmoneloses aviárias, entretanto existem poucos estudos a respeito.

Em virtude da falta de conhecimento sobre a importância do flagelo durante a infecção de aves por *Salmonella* spp. e considerando que as informações originadas em pesquisas sobre esse tema poderiam ser úteis para a compreensão da patogenia das salmoneloses aviárias, elaborou-se o presente trabalho.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Taxonomia e nomenclatura do gênero *Salmonella*

Atualmente o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* com seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) e a maioria dos sorovares e *Salmonella bongori* com 22 sorovares (GRIMONT & WEILL, 2007). A nomenclatura do gênero segue o esquema proposto por POPOFF et al. (1996). Segundo este esquema, por exemplo, o sorovar Enteritidis seria descrito como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, ou de forma simplificada *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*). Na classificação atual *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são considerados como variantes de um mesmo sorovar (*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum e biovar Pullorum) (GRIMONT & WEILL, 2007). Com intuito de simplificar a descrição, os dois biovars serão aqui denominados como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

Nas primeiras classificações taxonômicas do gênero *Salmonella*, as subespécies de *Salmonella enterica* eram consideradas como subgêneros e os sorovares como espécies. Na nomenclatura antiga os nomes dos sorovares denotavam uma síndrome (ex: *S. typhi*). Em muitos casos eram corretamente ou de maneira errônea correlacionados com a especificidade ao hospedeiro (ex: *S. abortus-ovis* e *S. typhimurium*) ou relatavam a região geográfica onde o sorovar havia sido isolado pela primeira vez (ex: *S. london*). Em 1968, foi decidido que os nomes compostos seriam condensados (ex: *S. typhimurium*) (GRIMONT & WEILL, 2007).

## 2.2 Patogenia das salmoneloses aviárias

As salmoneloses podem ocorrer em duas formas distintas. Aquela provocada por sorovares adaptados ao hospedeiro (ex: *S. Gallinarum* em aves), caracteriza-se por uma severa infecção sistêmica com pouco dano ao tecido intestinal, pouca colonização do trato digestório, podendo levar o hospedeiro à morte. A segunda forma seria a decorrente da infecção por sorovares que não possuem hospedeiro específico (ex: *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em aves). Neste caso, o quadro pode ter início no trato entérico, podendo evoluir para infecção sistêmica (VAN IMMERSSEL, 2005; BARROW, 2007). As interações entre os mecanismos invasão e evasão de *Salmonella* spp. com o sistema imune da ave determinarão a patogenia das salmoneloses aviárias (BERCHIERI & FREITAS NETO, 2009).

A maioria das informações sobre a patogenia de *Salmonella* spp. e as respostas imunes do hospedeiro foram originadas de estudos com camundongos experimentalmente infectados com o sorovar Typhimurium. Tais informações têm sido utilizadas para compreensão das salmoneloses aviárias sistêmicas, pela falta de informações a respeito da patogenia de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e das respostas imunes de aves (BARROW, 2007).

De acordo com CHAPPELL et al. (2009), as salmoneloses aviárias sistêmicas podem ser divididas em três fases distintas. A primeira seria a invasão intestinal e a segunda a infecção sistêmica. Na terceira fase, ocorreria a destruição de *Salmonella* spp. (ou *clearance*) presente nos tecidos ou a morte da ave, sendo que em alguns casos a ave se recupera da infecção, mas a bactéria persiste em número reduzido no interior de macrófagos em alguns tecidos.

A maioria das infecções por *Salmonella* spp. em aves se inicia pela via oral. Em mamíferos, *Salmonella* spp. invade o trato digestório na região das placas de Peyer e das células M, no íleo. Durante a invasão intestinal, uma enterite é provocada por proteínas efetoras, secretadas por um poro conhecido como sistema de secreção do tipo três (SSTT) que é codificado por genes do cromossomo bacteriano presentes na

ilha de patogenicidade de número um (SPI-1). O reconhecimento da proteína do flagelo e de lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular por receptores do tipo *toll* (TLR-5 e TLR-4), presentes nos enterócitos, desencadeia uma resposta pró-inflamatória com a produção de citocinas e quimiocinas, que ativam macrófagos e recrutam neutrófilos (heterófilos nas aves) e linfócitos para o local da invasão, intensificando a inflamação da parede intestinal (GEWIRTZ et al., 2000; GEWIRTZ et al., 2001; ZENG et al., 2003).

O intestino delgado é a principal área para invasão de *Salmonella* spp. em mamíferos. Em aves, esse órgão não possui linfonodos e as placas de Peyer não são bem definidas. As células M estão sobrepostas aos agregados linfóides e o seu papel no processo de invasão por *Salmonella* spp. em aves ainda não foi compreendido (SMITH & BEAL, 2008). O principal local de colonização do trato digestório para a maioria dos sorovares é o ceco (BARROW et al., 1991; DESMIDT et al., 1998; HENDERSON et al., 1999; BERNDT et al., 2007). Tanto *S. Gallinarum* como *S. Pullorum* o colonizam de forma ineficiente. As tonsilas cecais são o maior órgão linfóide secundário do trato digestório das aves. Há evidências de que *S. Gallinarum* tem predileção por esse órgão (BARROW & FREITAS NETO, 2011). A infecção do trato digestório de aves por *S. Typhimurium* induz a inflamação com um influxo de heterófilos. Nas infecções por *S. Pullorum* é notada apenas uma inflamação branda (HENDERSON et al., 1999). *In vitro*, durante a infecção de células epiteliais de aves por *S. Typhimurium*, ocorre uma elevada expressão de genes responsáveis pela produção de IL-6 (interleucina-6), CXCLi1 (CXC-quimiocina ligante-um, antes conhecida como K60) e CXCLi2 (antes denominada IL-8). Enquanto que discreto aumento ou mesmo uma expressão abaixo dos níveis basais é observada após a infecção por *S. Gallinarum* (KAISER et al., 2000). CHAPPELL et al. (2009) verificaram que a infecção experimental de aves com um dia de vida por *S. Enteritidis* causou um aumento na expressão de CXCLi1 e CXCLi2 na parede do íleo, 10 horas após o desafio, acompanhado de um aumento do número de heterófilos no tecido intestinal. Os autores observaram o inverso em aves desafiadas com *S. Pullorum*. Também foi demonstrado que a infecção de aves com um dia de vida por *S. Typhimurium* induziu a expressão de proteína inflamatória

macrofágica um beta (MIP-1 $\beta$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCLi1 e CXCLi2 no epitélio intestinal e no fígado (WITHANAGE et al., 2004), mas a infecção com um mutante de *S. Typhimurium* sem flagelos induziu a um baixo nível de expressão de IL-1 $\beta$  (IQBAL et al., 2005), enquanto que a inativação de genes que codificam o SSTT da SPI-1 levaram à redução da expressão de IL-6 (CHAPPELL et al., 2009).

O flagelo, o LPS e as proteínas secretadas pelo SSTT da SPI-1 estão envolvidos na inflamação intestinal durante a infecção por *Salmonella* spp. A importância do SSTT da SPI-1 durante a infecção de aves por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* ainda não foi investigada (BARROW & FREITAS NETO, 2011). Ao que tudo indica, a ausência de flagelo nesses dois biovars seria vantajosa para evitar o reconhecimento via TLR-5, facilitando o desenvolvimento da infecção sistêmica (KAISER et al., 2000; WIGLEY & KAISER, 2003; IQBAL et al., 2005).

Após a invasão, acredita-se que *Salmonella* spp. seria fagocitada por macrófagos ou por células dendríticas e transportada pelo sistema linfático para o fígado e baço (MASTROENI & MENAGER, 2003). A fagocitose de *Salmonella* spp. por macrófagos seria a chave para o desenvolvimento da infecção sistêmica em aves e mamíferos (BARROW et al., 1994). Neste contexto, a existência de outro SSTT, codificado por genes presentes na ilha de patogenicidade de número dois (SPI-2), seria crucial por auxiliar a sobrevivência bacteriana no interior de macrófagos (HENSEL, 2000). O SSTT da SPI-2 funciona como um poro utilizado pelo microrganismo para injetar proteínas efetoras dentro dos vacúolos de fagocitose (fagossomos), interferindo com o transporte intracelular e prevenindo a fusão entre os fagossomos e os lisossomos. O SSTT da SPI-2 também pode alterar a secreção de citocinas e a expressão do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (CHEMINAY et al., 2005). A perda de função do SSTT da SPI-2 impossibilita a sobrevivência de *Salmonella* spp. dentro de macrófagos e leva a completa atenuação de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* durante a infecção de aves e de *S. Typhimurium* em camundongos (JONES et al., 2001; WIGLEY et al., 2002a; JONES et al., 2007).

Macrófagos oriundos de linhagens de aves resistentes a infecções bacterianas sistêmicas têm maior capacidade de destruir *Salmonella* spp., por produzirem maiores quantidades de radicais reativos de oxigênio gerados pela enzima NADPH-oxidase. Estes são também capazes de produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias mais rapidamente e em maior quantidade que aqueles provenientes de aves susceptíveis (WIGLEY et al., 2002b; WIGLEY et al., 2006). A rápida e elevada produção de IL-18 pelos macrófagos é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa do tipo Th1, a qual eliminará a bactéria da ave (BERCHIERI & FREITAS NETO, 2009). Portanto, aves geneticamente resistentes às salmoneloses sistêmicas possuem imunidade inata mais forte e ativam resposta imune celular de maior intensidade que aves susceptíveis (CHAPPELL et al., 2009).

Em aves consideradas resistentes, a multiplicação bacteriana é controlada por meio da resposta imune adaptativa do tipo Th1. Quando essa resposta imune não é suficiente, ocorre proliferação bacteriana em baço e fígado, produzindo alterações macro e microscópicas nestes órgãos, tais como, aumento de volume, necrose multifocal e degeneração vacuolar (SMITH, 1955; POMEROY & NAGARAJA, 1991; FREITAS NETO et al., 2007; SHIVAPRASSAD & BARROW, 2008). A infecção sistêmica, como descrita no tifo aviário, provoca anemia e septicemia, geralmente levando o animal a morte entre 4 a 10 dias após a infecção (ASSOKU et al., 1970; SHIVAPRASAD, 2000; WIGLEY et al., 2006; FREITAS NETO, et al., 2007). No caso de infecção de aves com alguns dias de vida por *S. Pullorum*, frequentemente ocorre persistência do microrganismo na ave. Neste caso, apesar da destruição da maioria das bactérias, uma pequena parte persiste em macrófagos do baço (WIGLEY et al., 2001), o que não é comum em aves infectadas por *S. Gallinarum* ou por outros sorovares (BERCHIERI et al., 2001).

No paratifo aviário causado por *S. Typhimurium*, a fase sistêmica é marcada pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (principalmente IL-1 $\beta$ ), que resulta em esplenomegalia e hepatomegalia transitórias. A eliminação do microrganismo está associada à resposta Th1 e elevada produção de *interferon gama* (INF- $\gamma$ ) em torno de

14-28 dias após a infecção (BABU et al., 2004; BEAL et al., 2004; WITHANAGE et al., 2005). A produção de anticorpos (IgM) também pode ser detectada durante esse período (BEAL et al., 2006). Utilizando a estirpe vacinal *S. Gallinarum* 9R, a qual causa uma infecção sistêmica branda, WIGLEY et al. (2005) observaram tanto uma resposta celular antígeno-específica (com proliferação de células T e expressão de INF- $\gamma$ ) como a produção de anticorpos específicos. A eliminação da estirpe vacinal coincidiu com o pico de proliferação de células T e expressão de INF- $\gamma$ , sugerindo que a destruição do microrganismo dos tecidos seria mediada principalmente por imunidade celular com resposta do tipo Th1. Os anticorpos seriam importantes na proteção contra a reinfeção sistêmica, como foi demonstrado pelo uso de vacinas inativadas (WOODWARD et al., 2002).

Experimentalmente, *S. Pullorum* pode persistir no interior de macrófagos do fígado e baço de aves, por pelo menos 50 semanas (WIGLEY et al., 2001). Essa persistência deve-se ao SSTT codificado por genes da SPI-2. A transmissão vertical, importante na pulorose, depende deste fenômeno biológico, o qual não é totalmente compreendido. Após a fase sistêmica, o número de células de *S. Pullorum* no fígado e no baço diminui consideravelmente. Entretanto, o início da postura causa imunossupressão, facilitando a ocorrência de nova disseminação sistêmica do microrganismo, que atinge os órgãos reprodutivos (WIGLEY et al., 2005). Existem duas hipóteses para explicar a persistência de *S. Pullorum* em aves. De acordo com uma delas, a ausência de expressão do MHC por alguns macrófagos infectados faria com que os mesmos não fossem reconhecidos pelas células T. Uma outra possibilidade, seria a de que *S. Pullorum* induziria na ave uma resposta imune adaptativa do tipo Th2, associada à produção de IL-4 e IL-13. Em aves infectadas por *S. Pullorum*, a expressão de interleucinas associadas à resposta Th-1 (IL-18 e INF- $\gamma$ ) encontra-se abaixo dos níveis basais, enquanto que IL-4 é expressa em níveis elevados (CHAPPELL et al., 2009), sugerindo uma modulação do sistema imune para uma resposta Th2, com elevada produção de anticorpos e fraca resposta imune celular.



As salmoneloses aviárias causadas por sorovares sem hospedeiro específico, geralmente, provocam apenas uma enterite. Algumas estirpes de sorovares (como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*), porém, podem causar doença clínica com quadro sistêmico em aves recém-eclodidas ou com quedas de imunidade devido a processos imunossupressivos infecciosos ou fisiológicos (BARROW, 2007). Como descrito anteriormente, a invasão do trato intestinal de aves por esses sorovares provoca inflamação da parede intestinal que resulta na atração de heterófilos, macrófagos e produção de fator de necrose tumoral induzido por lipopolissacarídeos (LITAF), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), MIP-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, CXCLi1 e CXCLi2 (WINTHANAGE et al., 2004; WINTHANAGE et al., 2005; BERNDT et al., 2007). Em aves com um sistema imune hígido, essa resposta inflamatória inicial seria suficiente para impedir a infecção sistêmica, enquanto que o desenvolvimento de uma resposta imune humoral, com produção de IgA, favoreceria a eliminação dos microrganismos do trato digestório (DESMIT et al., 1998; FARNELL et al., 2001).

#### **4.3 Considerações sobre o genoma de *Salmonella* spp.**

A análise dos dados gerados nas últimas duas décadas, a respeito do genoma e do proteoma de *Salmonella* spp., tem sido útil para a compreensão do processo de adaptação da bactéria ao hospedeiro e de aspectos ligados à patogenicidade. Algumas dessas informações podem contribuir para o entendimento das salmoneloses aviárias uma vez que foram geradas a partir de sorovares frequentemente implicados nestas enfermidades.

O genoma de *S. Gallinarum* é constituído por 4.659.000 pares de bases nitrogenadas e possui 309 pseudogenes, ao passo que *S. Enteritidis* tem um genoma de 4.686.000 pares de base com 113 pseudogenes (THOMSON et al., 2008). Existem 130 sequências codificadoras específicas ou (CDS) em *S. Enteritidis* que não aparecem em *S. Gallinarum*; as quais parecem ser aquisições recentes ou que estão em processo de deleção em *S. Gallinarum*. A presença de um genoma reduzido em *S. Gallinarum*

com vários pseudogenes indica que muitos genes são requeridos para a produção de doença entérica (THOMSON et al., 2008).

Foi proposto que a ausência de motilidade em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* seria uma adaptação ao organismo das aves (LI et al., 1993). Mas as bases biológica e molecular que explicariam essa adaptação ainda não foram compreendidas (BARROW et al., 1994; PASCOPELLA et al., 1995; STEINBACH et al., 2000; UZZAU et al., 2000; UZZAU et al., 2001; PAULIN et al., 2002; OSMAN et al., 2009; ESWARAPPA et al., 2009). Em alguns estudos correlaciona-se a patogenicidade e a adaptação de *S. Gallinarum* às aves com a capacidade de multiplicação em macrófagos (BARROW et al., 1994; WALLIS et al., 1999; STEINBACH et al., 2000; CHADFIELD et al., 2003).

*S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são imóveis, apesar de existirem trabalhos demonstrando a reversibilidade deste fenótipo em *S. Pullorum* (HOLT & CHAUBAL, 1997; CHAUBAL & HOLT, 1999). O gene *fliC* em *S. Gallinarum*, responsável pela expressão da flagelina, está íntegro ou seja, possui sequência de nucleotídeos completa. Entretanto, esse microrganismo possui mutações em cinco genes (*cheM*, *flhA*, *flhB*, *flgK* e *flgI*) distribuídos em dois *loci* envolvidos na síntese do flagelo (THOMSON et al., 2008), o que explicaria a ausência de flagelo.

Na comparação do conteúdo gênico de *S. Pullorum* com *S. Gallinarum* e outros sorovares, por meio da técnica de microarranjos, PORWOLLIK et al. (2005) notaram a ausência do sistema regulatório *torRS* (envolvido na regulação da enzima N-óxido de trimetilamina redutase) em *S. Pullorum* e em *S. Abortusovis*, mas estes estavam presentes em *S. Gallinarum* e em outros sorovares. Situação intermediária foi observada em uma estirpe de *S. Pullorum* que não possuía o sistema *torRS*, não possuía hidrolase (ausente na maioria das estirpes de *S. Gallinarum*) e não continha várias regiões do genoma normalmente presentes em *S. Gallinarum*. QIUCHUN et al. (2009), utilizando o método de hibridização com supressão subtrativa, identificaram alguns genes de virulência em *S. Pullorum* que não foram encontrados em *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum*. Entre eles estão o gene *ipaJ* (gene plasmidial de *Shigella* com funções de invasão), o gene para a produção de colicina Y (proteína antimicrobiana codificada

por um plasmídio de *E. coli*) e os genes fimbriais plasmidiais *faeH*, *fael* e *traG*, os quais codificam algumas proteínas envolvidas na mobilização de DNA.

A descoberta do envolvimento de pequenos fragmentos de RNA não codificadores (sRNAs) na regulação gênica de bactérias, arqueobactérias e eucariotos (WASSARMAN, 2002; MASSÉ et al., 2003; PADALON-BRAUCH et al., 2008) modificou o conceito do “dogma central”. Uma categoria desses sRNAs se liga aos RNAs mensageiros com ajuda de proteínas (*chaperones*), impedindo que sejam traduzidos. Em *S. Typhimurium* foram identificados 64 sRNAs, sendo que metade está associada ao *chaperone* Hfq. Também foi demonstrado que essa proteína controla a expressão de um quinto dos genes desse sorovar, incluindo genes de algumas SPIs (SPI-1, SPI-2, SPI-4 e SPI-5), dois fatores sigmas de regulação e os genes responsáveis pela produção do flagelo (SITTKA et al., 2008). Até o presente momento não se têm registros de estudos envolvendo sRNAs em *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Enteritidis*.

#### **4.4 Estrutura, funcionamento e regulação gênica do flagelo em *Salmonella* spp.**

As bactérias se movimentam em gradientes químicos utilizando um dos menores e mais complexos motores da biosfera, o flagelo. Geralmente eles variam de cinco a dez unidades por célula (MACNAB, 1992). São praticamente idênticos em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, exceto pelo fato de que os primeiros emergem de uma segunda membrana externa a qual está ausente em bactérias Gram-positivas (CHEVANCE & HUGHES, 2008). Os flagelos das arqueobactérias são um pouco diferentes. O filamento é mais fino, não possui um canal central e por isso a polimerização da flagelina (ou FliC) é realizada de maneira diferente dos demais flagelos (BARDY et al., 2004).

Os flagelos também ajudam na função sensorial, permitindo que a bactéria responda a estímulos químicos e evite ambientes desfavoráveis, tais como, extremos de pH e elevadas concentrações salinas. Parece que esta estrutura estaria ainda envolvida na colonização intestinal e na patogenicidade de *S. Typhimurium* e *S.*

Enteritidis (ALLEN-VERCOE & WOODWARD, 1999; DIBB-FULLER & WOODWARD, 2000; PARKER & GUARD-PETTER, 2001; ROBERTSON et al., 2003).

Conforme a movimentação do flagelo, as bactérias podem exibir dois tipos de motilidade: *swimming* e *swarming*. Na *swimming*, que acontece em meios líquidos, o flagelo gira no sentido anti-horário, impulsionando a bactéria para um ponto distal do ponto de partida. Quando a bactéria encontra um ambiente desfavorável ou nocivo, o flagelo passa movimentar-se em sentido horário, produzindo um movimento chamado *tumbling* ou rolamento (HARSHEY, 2003), que é observado até a reorientação para nova trajetória. Enquanto a motilidade do tipo *swimming* é individual, a do tipo *swarming* ocorre em grupo e é relacionada à movimentação em superfícies (HARSHEY, 1994). Nesse tipo de motilidade as bactérias se diferenciam em hiperflageladas e são mais alongadas (HARSHEY & MATSUYAMA, 1994; HARSHEY, 2003).

Os flagelos são constituídos por um longo filamento helicoidal composto por polímeros de flagelina (em torno de 20.000 monômeros) o qual emerge de um “gancho” (*hook*) conectado a um corpo basal (*basal body*) que está ancorado no interior da membrana celular (Figura 1) (ALDRIDGE & HUGHES, 2002; MACNAB, 2003; PALLEN & MATZKE, 2006).

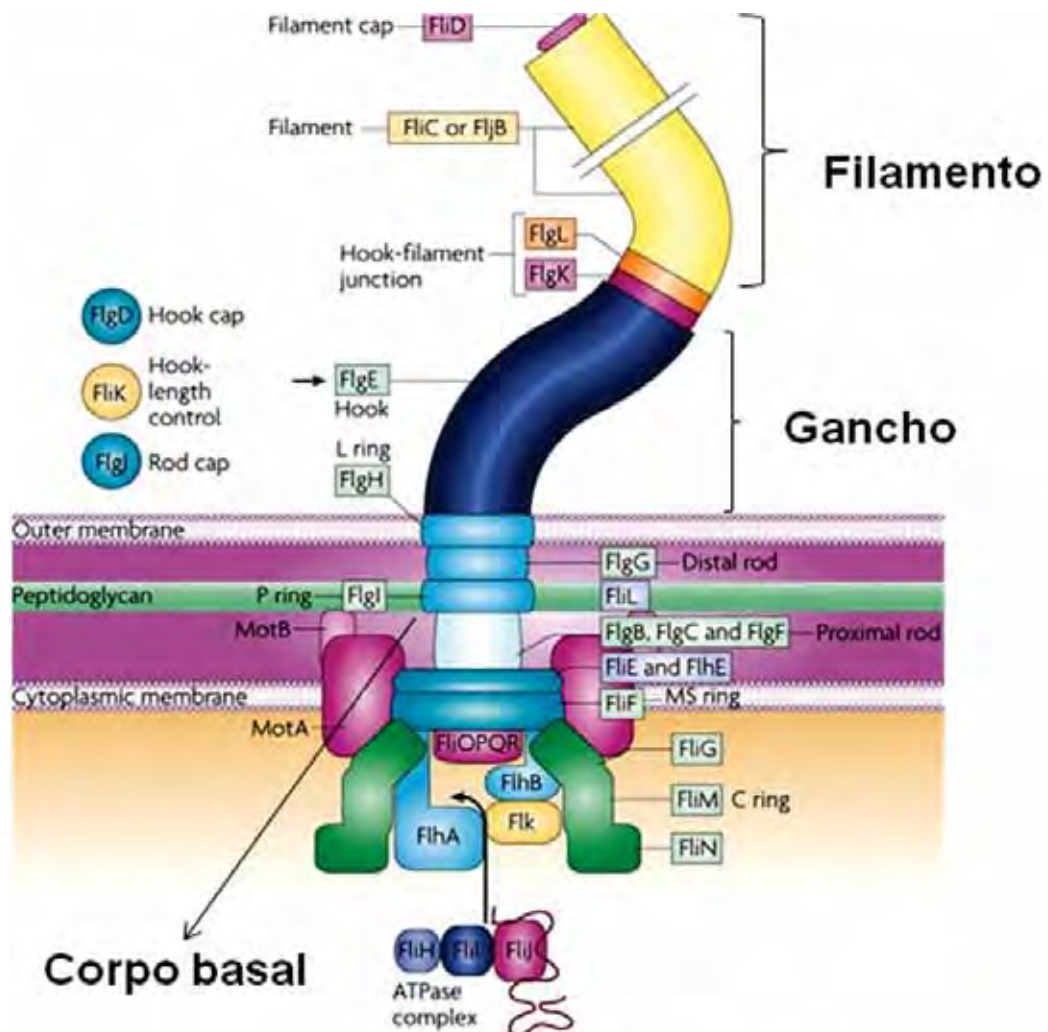


Figura 1. Ilustração de um flagelo de *Salmonella* spp. com as principais proteínas que compõem essa organela (adaptado de CHEVANCE & HUGHES, 2008).

O filamento é uma estrutura longa, delgada e cilíndrica de formato helicoidal que quando movimentado funciona como uma hélice. Consiste de 11 fibras ou protofilamentos em *S. Typhimurium* e *Escherichia coli*, e sete em *Campylobacter jejuni* (GALKIN et al., 2008). Juntos, os protofilamentos formam uma estrutura de formato cilíndrico. As interações quaternárias entre as subunidades da flagelina tornam o filamento assimétrico (MACNAB, 1996; MACNAB, 2003).

O gancho do flagelo é uma estrutura cilíndrica similar ao filamento e funciona como conector entre o filamento e o corpo basal (MACNAB, 2003). Possui arranjo similar ao filamento, porém é constituído por outro monômero protéico, o FlgE. Outras proteínas estão envolvidas na regulação do comprimento e término do gancho (FliK e FlgD) (CHEVANCE & HUGHES, 2008). O corpo basal, por sua vez é uma estrutura complexa que está embebida na superfície celular, sendo na verdade o motor do flagelo. É composto por uma haste (em inglês *rod*) e um conjunto de quatro anéis. Os dois anéis externos (denominados de L e P) estão separados, porém parecem estar conectados por uma parede cilíndrica, enquanto que os dois anéis interiores (S e M) estão juntos e de fato representam domínios de uma única proteína (FliF). Por esta razão a terminologia adotada seria anel “MS” ou “C”. Considerações geométricas e bioquímicas sugerem que o anel “L” está no plano da camada de lipopolissacarídeo, o anel “P” na camada de peptidoglicanos e o anel “MS” ou “C” na membrana celular (MACNAB, 1996). Pelo menos oito proteínas fazem parte do corpo basal. Quatro delas compõem a haste (FlgB, FlgC, FlgF e FlgG), três fazem parte dos anéis (FlgH, FlgI e FliF) e existe ainda uma outra (FliE) cuja localização é desconhecida (MACNAB, 2003).

O anel “MS” funciona como uma placa conectora de componentes essenciais para ignição e rotação do motor. A haste tem a função de transmitir o torque do motor para o gancho e o filamento. Os anéis “L” e “P” juntos funcionam como um componente protetor ou “bucha” por onde a haste passa, protegendo-a contra forças laterais que poderiam interferir na rotação. Ligadas ao anel “MS” encontram-se três proteínas (FliG, FliM e FliN) que estão envolvidas na mudança de sentido de rotação. Duas outras proteínas, MotA e MotB estão integradas à membrana e atuam na rotação do motor (MACNAB, 2003).

Com exceção das proteínas que formam os anéis “P” e “L”, que são secretadas por outra via, o restante das proteínas externas que compõe a estrutura flagelar (FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, FlgI, FlgE, FlgD, FliC, FliD e FlgM) atravessam a membrana citoplasmática por um sistema de secreção do tipo três (SSTT) ou uma espécie de canal localizado dentro do corpo basal. O SSTT flagelar é composto por sete proteínas

de membrana (FlhA, FlhB, FliF, FliO, FliP, FliQ e FliR) e três proteínas solúveis que formam um complexo ATPase (FliH, FliI e FliJ) (MACNAB, 2003), embora tanto a movimentação do flagelo como a secreção sejam dependentes de energia gerada pelo deslocamento de prótons. O trifosfato de adenosina (ATP) gerado por esse complexo (FliHIJ) tem a função de ajudar no processo de secreção (CHEVANCE & HUGHES, 2008). Foi demonstrado que proteína FliJ seria também uma transportadora de substratos formadores do gancho, haste e filamento do flagelo (MINAMINO et al., 2000).

A rotação do flagelo é proporcionada por um motor movido a íons, o qual é formado por complexos proteicos. As proteínas de membrana, MotA e MotB formam um condutor iônico necessário para a rotação do motor (BERG, 2003). As proteínas transmembrânicas CheA, CheM e CheW são “receptores” quimiotáticos e definem o sentido de rotação do flagelo. O motor pode alternar de sentido anti-horário para horário, por meio de uma interação entre CheY e três subunidades proteicas (FliG, FliN e FliM). FliG está envolvida na rotação do motor, interagindo com a proteína de ignição MotA e com a proteína do anel “MS” (FliF). FliM tem a função de mudar o sentido de rotação ao se ligar no sítio de CheY. Enquanto que FliN também atua na mudança de sentido de rotação e provavelmente contribui para secreção de proteínas ao interagir com o complexo ATPase-FliHIJ (PAUL et al., 2006).

Em *S. Typhimurium* mais de 50 genes agrupados em 17 *operons* localizados em quatro *loci* do genoma são requeridos neste processo (MACNAB, 1996). A transcrição desses genes forma uma “cascata” organizada para a montagem da estrutura do flagelo. Levando em consideração a ordem de transcrição, esses “operons” são agrupados em três classes (classe 1, 2 e 3) (CHILCOTT & HUGHES, 2000).

A “cascata” do controle gênico se inicia com o *operon flhDC*, cujos produtos são necessários para expressão dos *operons* de classe 2 e 3. Por isso, esse *operon* é denominado *operon* mestre ou *operon* de classe 1. Os produtos do *flhDC* ativam os *operons* de classe 2 ou atuam como auto-repressores do próprio *flhDC* (LIU & MATSUMURA, 1994; LIU & MATSUMURA, 1996; YANAGIHARA et al., 1999).

Os *operons* de classe 2 direcionam a montagem da estrutura do copo basal e do gancho (CBG) do flagelo e do SSTT. Outros três genes transcritos a partir dos *operons* de classe 2 (*flgK*, *flgL* e *fliD*), são expressos mais tarde, após a construção do CBG (KUTSUKAKE & IDE, 1995). Parte dos genes com função estrutural e outros com função regulatória (*fliA* e *flgM*) também são transcritos a partir dos *operons* de classe 2 (GILLEN & HUGHES, 1993; IKEBE et al., 1999).

O *fliA* codifica um fator de transcrição, o  $\sigma^{28}$ , o qual direciona a transcrição dos *operons* de classe 3. O fator  $\sigma^{28}$  é inativado, até a completa montagem do CBG, pelo fator anti- $\sigma^{28}$ , produzido pelo gene *flgM* (KARLINSEY et al., 2000). O SSTT flagelar é responsável por levar o substrato (proteínas) para o local de formação do CBG. Com o término da construção do CBG ocorre a transcrição dos genes a partir dos *operons* de classe 3 e um novo substrato proteico é formado (FlgK, FlgL, FliD, FlgM e FliC), o qual, por meio do SSTT, será transportado para a formação do filamento do flagelo (FRASER et al., 2003).

Dois ou mais tipos distintos de flagelina (geralmente FliC e FljB) são expressos alternadamente. Esse fenômeno é conhecido como variação de fase flagelar e ocorre em muitos sorovares de *Salmonella*, mas não com *S. Enteritidis* o qual possui apenas o gene para a proteína FliC (IMRE et al., 2005). A variação da flagelina é controlada pela inversão de um fragmento de DNA de 996 nucleotídeos, denominado fragmento H, o qual contém o promotor (sequência de DNA onde a transcrição do gene se inicia) para o gene *fljB*. O segmento H é flanqueado por sequências repetidas de 26 nucleotídeos, *hixL* e *hixR*. Essa recombinação é mediada pela DNA invertase (Hin), cujos genes estão localizados dentro do segmento H. O *fljB* constitui um *operon* juntamente com o *fljA* que codificam um regulador negativo para a expressão do *fliC*. Quando o segmento H está orientado no sentido *on*, tanto *fljB* como o *fljA* são transcritos, resultando na síntese da flagelina de fase 2. Quando o segmento H está na orientação *off*, o *fljB* e o *fliA* não são expressos, resultando na síntese da flagelina de fase 1 (ALDRIDGE et al., 2006; YAMAMOTO & KUTSUKAKE, 2006; TOMINAGA & KUTSUKAKE, 2007).



A flagelina produzida por bactérias do gênero *Salmonella* é formada por 494 aminoácidos, com domínios distintos nos diferentes sorovares (JOYS, 1985; SMITH & SELANDER, 1990). As porções iniciais (amino-terminal) e finais (carboxi-terminal) da flagelina são bem conservadas nos sorovares. As variações se dão na região central (região hipervariável). As porções iniciais e finais da proteína estão expostas para o interior do filamento flagelar (SAMATEY et al., 2001; YONEKURA et al., 2003), enquanto que a porção central está para fora do filamento, o que explicaria o fato da produção de anticorpos terem como alvo a região hipervariável (JOYS & SCHODEL, 1991).

O controle dos genes flagelares em *S. Typhimurium* está esquematizado resumidamente na Figura 2. Os genes responsáveis pela produção do flagelo estão localizados em quatro *loci* (I, II, IIIa e IIIb) do genoma bacteriano.

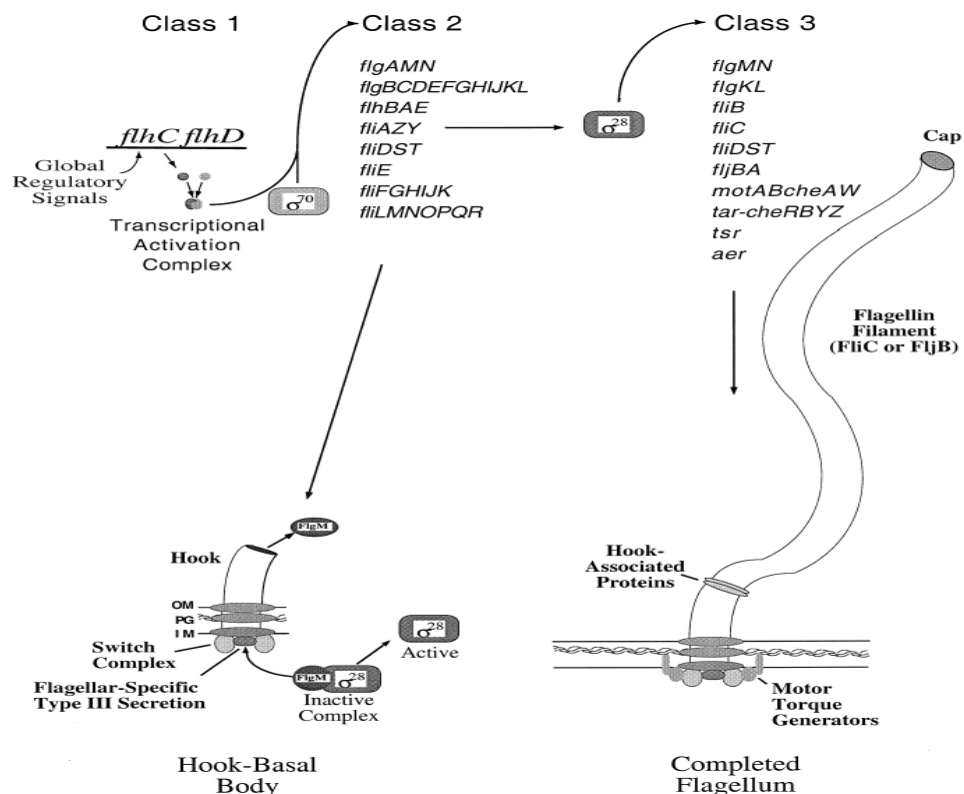


Figura 2. Esquema da regulação dos genes responsáveis pela produção do flagelo. O processo de construção do flagelo se inicia com expressão dos genes *flhC* e

*flhD*, cujos produtos ativam a expressão dos *operons* de classe 2 para a construção do corpo basal e do gancho (CBG). O fator anti- $\sigma^{28}$  (FlgM) inibe o fator  $\sigma^{28}$  (FliA) até a completa montagem do CBG. Após a construção do CBG, o fator  $\sigma^{28}$  passa a ativar os *operons* de classe 3, finalizando a construção do filamento (adaptado de KARLINSEY et al., 2000).

## 2.5 Flagelina e interação com receptores do hospedeiro

O sistema imune inato possui receptores capazes de reconhecer moléculas conservadas específicas de microrganismos, também conhecidas como PAMPs (em inglês *pathogen associated molecular patterns*). As respostas contra PAMPs extracelulares são mediadas por receptores localizados na membrana de células epiteliais e de células do sistema imune como os do tipo *toll* (TLRs), os quais induzem a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, direcionando o sistema imune no combate aos patógenos invasores (AKIRA & TAKEDA, 2004). Os TLRs respondem a diversos PAMPs, incluindo a flagelina, o LPS, lipopeptídeos e ácidos nucléicos associados a vírus (MEDVEDEV et al., 2006). Quando os patógenos alcançam o interior das células do hospedeiro, os PAMPs são reconhecidos por receptores da família *Nod* (NLRs) (GIRARDIN et al., 2003; FRANCHI et al., 2006; MIAO et al., 2007). Similar aos TLRs, os NLR (Nod1 e Nod2) induzem a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral, a IL-6 e IL-12 (KOBAYASHI et al., 2005). Outros membros da família NLR, como o Ipaf e Nalp1-3, ativam a *capatase-1*, levando a secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (MARIATHASAN et al., 2004). Os TLRs iniciariam uma resposta pró-inflamatória, indicando que microrganismos ultrapassam a barreira física da camada epitelial. Os NLRs, então, intensificariam a ativação do sistema imune. Portanto, a interação entre as respostas de TLRs e NLRs seria importante para o desencadeamento de respostas imunes adaptativas contra patógenos invasores, capazes de suplantarem o sistema imune inato (MIAO et al., 2007).

A flagelina seria uma das poucas proteínas que são PAMPs e por isso é reconhecida pelo sistema imune inato, sendo detectada tanto extracelularmente pelos TLR-5, como intracelularmente pelos receptores Ipaf (MIAO et al., 2007; SIMON & SAMUEL, 2007). Os TLR-5 detectam os nonômeros de flagelina e ativam uma resposta de transcrição via MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), que resulta na ativação de NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa*) que por sua vez induz a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-1  $\beta$ , IL-6, CXCLi2) (TALLANT et al., 2004; UEMATSU et al., 2006). Os Ipaf respondem à flagelina intracelular ativando a enzima *capatase-1* que desencadeia a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (BRENNAN & COOKSON, 2000).

Segundo SUBRAMANIAN & QADRI (2006), a flagelina biologicamente ativa, capaz de ativar os receptores do sistema imune do hospedeiro, não seria parte do filamento flagelar, ao contrário disso, seria sintetizada novamente quando *S. Typhimurium* entraria em contato com moléculas de lisofosfolipídeos produzidas pelas células intestinais do hospedeiro. Entretanto, existem autores que consideram a despolimerização do flagelo como a fonte de monômeros de flagelina que ativaria o sistema imune (MIAO et al., 2007).

Existem algumas hipóteses para explicar a secreção e a interação da flagelina com os receptores do hospedeiro. Ainda não se sabe ao certo como isso ocorreria. Utilizando células epiteliais de seres humanos, GEWIRTZ et al. (2001) demonstraram que durante a infecção por *Salmonella* spp. a flagelina seria, de alguma forma, transportada para a região basolateral da monocamada de células epiteliais intestinais, onde ocorreria a expressão de TLR-5. Posteriormente, comprovou-se que esse transporte seria dependente de uma vesícula produzida por genes presentes na SPI-2 (LYONS et al., 2004). Em camundongos, detectou-se TLR-5 na região apical do epitélio intestinal (BAMBOU et al., 2004) e também em células dendríticas da lâmina própria (UEMATSU et al., 2006). De acordo com SUN et al. (2007), a flagelina capaz de ativar os receptores Ipaf seria transportada ou injetada no citoplasma de macrófagos do hospedeiro pelo SSTT da SPI-1. A necessidade de genes presentes nas SPIs para o

transporte da flagelina de *Salmonella* spp. até os receptores (TLR-5 e Ipaf) do hospedeiro explicaria porque bactérias comensais, que possuem flagelos mas não possuem SPIs em seu genoma, como *Escherichia coli*, não são capazes de estimular os TLR-5 e os Ipaf.

A maioria do conhecimento gerado a respeito desse tema (interação entre flagelina, TLR-5 e Ipaf) provém de estudos *in vitro* com *S. Typhimurium* em cultivo de células epiteliais de mamíferos (GEWIRTZ et al., 2001; LYONS et al., 2004; SUBRAMANIAN & QADRI, 2006; SUN et al., 2007). Não se sabe até que ponto tais informações poderiam ser utilizadas para o entendimento da patogenia das salmoneloses aviárias, uma vez que não há informações de qual região dos enterócitos das aves estão os TLR-5, nem da presença de NLR nestes animais e nem de uma segunda síntese e secreção de monômeros de flagelina pelos principais sorovares envolvidos nas salmoneloses aviárias.

A flagelina é um potente ativador de várias linhagens celulares envolvidas na resposta imune inata e adaptativa. A eficiência dessa proteína como adjuvante tem sido comprovada em diferentes formulações de vacinas virais e bacterianas (MIZEL & BATES, 2010). Há, portanto, um reconhecido potencial do seu uso para melhoria de muitas vacinas existentes, incluindo aquelas empregadas em avicultura industrial.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar se a presença de flagelo altera a patogenicidade de *S. Gallinarum*.

#### 3.2 Específicos

3.2.1. Comparar e analisar a sequência dos genes responsáveis pela produção do flagelo em *S. Gallinarum* e *S. Enteritidis*.

3.2.2. Utilizar as informações obtidas no item 3.2.1 para criar, por métodos moleculares, um mutante *S. Gallinarum* capaz de produzir flagelos (SG Fla+).

3.2.3. Mensurar a expressão do gene *fliC* *in vitro* em estirpes de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e nos mutantes SG Fla+, *S. Enteritidis* com deleção do gene *fliC* (SE  $\Delta fliC$ ) e *S. Enteritidis* como o *fliJ* inativo (SE  $\Delta fliJ$ ).

3.2.4. Avaliar a capacidade de invasão de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$  para células epiteliais (extraídas de rins de pintaínhos).

3.2.5. Analisar a sobrevivência de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$  em macrófagos de galinhas (linhagem HD 11).

3.2.6. Mensurar a expressão de genes responsáveis por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em células epiteliais (extraídas de rins de pintaínhos) infectadas com *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ .

3.2.7. Quantificar a expressão de genes responsáveis por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e daquelas ligadas à resposta imune adquirida em macrófagos de

galinhas (linhagem HD 11) experimentalmente infectados com *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ .

3.2.8. Infectar aves susceptíveis ao tifo aviário com as estirpes SG Fla+ e *S. Gallinarum* para avaliar comparativamente os sinais clínicos, a mortalidade e as alterações anatomopatológicas nos cecos, baço e fígado das aves, verificando a presença das estirpes nos órgãos mencionados.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em parceria com o Dr. Paul Barrow, professor de doenças infecciosas da Escola de Medicina Veterinária e Ciência da Universidade de Nottingham do Reino Unido.

### 4.1 Comparação e análise das sequências gênicas

As sequências dos genes envolvidos na produção do flagelo (distribuídos nos *loci* I, II, III a e III b) de *S. Gallinarum* 287/91 foram comparadas com as sequências desses genes em *S. Enteritidis* P125109 por meio dos softwares Artemis v.11 e ACT (*artemis comparison tool*) (CARVER et al., 2005).

### 4.2 Bactérias

Foram utilizadas as estirpes *Salmonella* Enteritidis P125109 (SE), *S. Pullorum* 44987 (SP), *S. Gallinarum* 287/91 (SG) e *S. Typhimurium* 4/74 (ST), as quais foram isoladas de aves e mantidas pelo Dr. Paul Barrow em seu laboratório. SG era resistente ao ácido nalidíxico.

### 4.3 Preparo dos mutantes

Após a comparação das sequências dos genes envolvidos na produção do flagelo em SG e SE, cinco pseudogenes foram identificados em SG. Dois estavam no *locus* I (de 12.000 pares de bases) e três no *locus* II (de 14.000 pares bases). Os

pseudogenes estavam cercados de genes funcionais, fundamentais para a produção do flagelo. Deste modo, optou-se pela substituição dos *loci* I e II de SG por *loci* homólogos (sem a presença de pseudogenes), oriundos do genoma de SE. Inicialmente, utilizando-se a técnica do *Lambda-Red* (DATSENKO & WANNER, 2000) (veja as páginas 25, 26 e o item 4.3.1 para compreender a técnica), genes de resistência a antibióticos (cassetes) foram inseridos em sequências não codificadoras adjacentes às extremidades dos *loci* I e II do genoma de SE e posteriormente, uma a uma, estas regiões foram transferidas para o genoma de SG por meio de transdução com o bacteriófago ØP22 (item 4.3.2). O *locus* I recebeu, em uma das extremidades, o cassete de resistência ao cloranfenicol (Cf<sup>r</sup>) e na outra, resistência à canamicina (kn<sup>r</sup>). Colônias de SE Cf<sup>r</sup> kn<sup>r</sup> foram selecionadas por passagem em placas de Petri com ágar nutriente (OXOID: CM0003) contendo canamicina (Kn) e cloranfenicol (Cf) nas concentrações de 20 µg/mL cada. Posteriormente, as colônias foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a confirmação da inserção correta dos cassetes. O *locus* II recebeu um cassete Cf<sup>r</sup> na extremidade que antecede o gene *flhD*. Colônias de SE Cf<sup>r</sup> foram selecionadas por passagem em ágar nutriente contendo Cf na concentração de 20 µg/mL e então submetidas à PCR. Ao final, duas estirpes de SE foram produzidas; uma SE *flgLN* Cf<sup>r</sup> Kn<sup>r</sup> (marcação do *locus* I) e a outra, SE *flhD* Cf<sup>r</sup> (marcação do *locus* II).

Utilizando-se a transdução com o bacteriófago ØP22 (WING, 1968; SAMBROOK & RUSSEL, 2001) o *locus* II de SE foi transferido para o genoma de SG. A substituição dos pseudogenes em SG foi comprovada com a amplificação e sequenciamento do gene *flhA* (último pseudogene do *locus* II em SG) de várias colônias, utilizando-se os iniciadores descritos na Tabela 1. O resultado do sequenciamento do gene *flhA* foi analisado na interface *on-line* para comparação de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos denominada MultAlin (CORPET, 1988), disponível no endereço eletrônico: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. Escolheu-se uma das colônias de SG a qual o sequenciamento comprovou a substituição do *flhA*. Em seguida, Cf<sup>r</sup> foi eliminado com auxílio do plasmídio pcp20. Da mesma forma, providenciou-se a



transdução do *locus* I para a colônia de SG previamente selecionada. O mutante final era Cf<sup>r</sup> e Kn<sup>r</sup>, sendo denominado posteriormente como SG Fla+.

A técnica do *Lambda-Red* e da transdução com o bacteriófago ØP22 também foram adotadas para o preparo de dois mutantes de SE, os quais tiveram os genes *fliC* e *fliJ* inativados (SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ ).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificar os genes *flhA*

Identificação do iniciador	Sequência
flhA D	5'- ataggcagcgcggcggaaag -3'
flhA R	5'-cggtagcgcgcaggctgtaa-3'

Seguindo a metodologia do *Lambda-Red* (DATSENKO & WANNER, 2000), genes de resistência a antibióticos foram recombinados ao genoma de SE por eletroporação (veja Figura 3). Antes da inserção dos cassetes, as células de SE receberam o plasmídio pkD46, tornando-se competentes para recombinação. O fragmento de DNA recombinante consistia de parte da sequência do genoma de SE em suas extremidades e um gene de resistência a antibiótico na região central. O fragmento foi amplificado por PCR, utilizando-se iniciadores de mutagênese (veja item 4.3.1) e plasmídios molde (pkD3 Cf<sup>r</sup> ou pkD4 Kn<sup>r</sup>) contendo genes de resistência a antibióticos. A região não codificadora das sequências dos cassetes Cf<sup>r</sup> e Kn<sup>r</sup> possuíam sítios de restrição para a enzima *FLP-recombinase*, o que permitiu a eliminação dos mesmos após a eletroporação do plasmídio pcp20, o qual é capaz de sintetizar essa enzima.

Essa técnica tem o risco de recombinação dos fragmentos de DNA em outras partes do genoma bacteriano, além da região alvo, por isso a adoção da técnica de transdução com o bacteriófago ØP22 (WING, 1968; SAMBROOK & RUSSEL, 2001) foi necessária para a obtenção das estirpes mutantes finais.

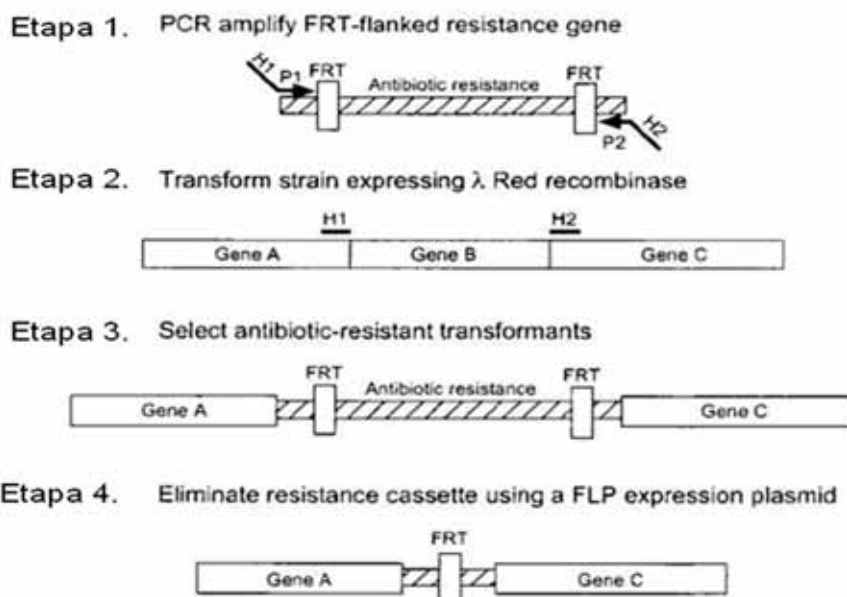


Figura 3. Ilustração da técnica do *Lambda-Red*. A Etapa 1 consiste na amplificação do gene de resistência a antibiótico por meio da PCR. Na etapa 2, as células bacterianas que serão mutadas recebem, por meio de eletroporação, o plasmídeo pKD 46. Em seguida, por eletroporação, o gene de resistência é inserido na bactéria, substituindo parte do genoma ou um gene alvo (etapa 3). Com auxílio da enzima *FLP-recombinase*, sintetizada pelo plasmídeo pcp 20, o gene de resistência é eliminado do genoma (adaptado de DATSENKO & WANNER, 2000).

#### 4.3.1 Escolha da sequência alvo, construção dos iniciadores, amplificação dos fragmentos de DNA recombinante e eletroporação

Para inativação dos genes *fliC* e *fliJ* e marcação dos *loci* I e II do genoma de SE, selecionou-se as primeiras 50 bases nitrogenadas da sequência alvo e as últimas 50 da fita complementar. A sequência das 50 primeiras bases juntamente com 20 bases da sequência do cassete do antibiótico (sequência que antecede o código de início do cassete) formaram o iniciador direto de mutagenese. As 50 últimas bases da fita

complementar e 20 bases da fita complementar do cassete do antibiótico (sequência posterior ao código de parada) formaram o iniciador reverso de mutagênese. Iniciadores direto e reverso (denominados de controle), utilizados para verificação da correta inserção dos cassetes, foram construídos tendo como alvo as sequências anterior e posterior ao local de inserção dos cassetes. Também com o objetivo de verificar a inserção dos cassetes, foram construídos iniciadores direto (C2 e K2) e reverso (C1 e K1), tendo como alvo a sequência central dos cassetes de cloranfenicol ou canamicina. Para construção dos iniciadores foram utilizados os softwares CLC *sequence viewer* 6.3 (CLC BIO), Artemis v11 (CARVER et al., 2005) e Primer premier 5 (PREMIER BIOSOFT INTERNATIONAL). A Tabela 2 contém as sequências dos iniciadores utilizados.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados na produção dos mutantes.

Número	Identificação do iniciador	Sequência
1	C1	5'- ttatacgcaaggcgacaagg-3'
2	C2	5'- gatcttccgtcacaggtagg-3'
3	K1	5'- cagtcatagccgaatagcct-3'
4	K2	5'- cggcgccctgaatgaactgc-3'
5	flhD_ctrD (yecG)	5'- ggtctcctcatgcataaccg-3'
6	flhD_ctrR (flhD)	5'- aatcctgagtcaaaccgggtg-3'
7	flhE_50D	5'- ccgcccctttcttggcaggtagcagacctgactctcttttgaataaat <b>gtgtaggctggagctgcttc-3'</b>
8	flhE_50R	5'- ttgcttaacctctgtgtaatgctgaattcagtgctgcgtagctgcttacc <b>catatgaatcctccttag-3'</b>
9	flhE_ctrD (flhE)	5'- cgttatgaactgaatggccc-3'
10	flhE_ctrD	5'- tagtatcgatcacgcgtcca-3'
11	flgN_50F	5'- attgccgatggcgactgtgccttccggcctgaatgcctgtagg <b>gtgtaggctggagctgcttc-3'</b>
12	flgN_50R	5'- gtgctgggctttaaagtgaagagttgttcgcccggacggcgtaaattc <b>catatgaatcctccttag-3'</b>
13	flgN_ctrD (flgN)	5'- atcgagcgaatcaacaggc-3'
14	flgN_ctrR (mviN)	5'- atttccgtactggtgatggc-3'
15	fliC50D	5'- gatacaagggttacgggtgagaaaccggtgggcaacagcccaataa <b>gtgtaggctggagctgcttc-3'</b>
16	fliC50R	5'- gcttccgctgcctgattgtgtaccagtgctggtgaatcaatcgccgga <b>catatgaatcctccttag-3'</b>
17	fliC_ctrD	5'- gttatcgcaatctggaagc-3'
18	fliC_ctrR	5'- ggtgacaaaggcagggtcag-3'
19	flgL_50D	5'- cacctcttttgaacatatacagaaactggatagttttgtctgcccgc <b>gtgtaggctggagctgcttc-3'</b>
20	flgL_50R	5'- gtaaatgctgatacaagccgaccgccaggtcggcttttatgccctt <b>catatgaatcctccttag-3'</b>
21	flgL_ctrD (flgL)	5'- agtacgctggattcactggg-3'
22	flgL_ctrR (rna)	5'- gacgatcataatcacgcca-3'
23	flhB_D	5'- gcagcggcgcgatgatggaag-3'
24	flhB_R	5'- cggcggcgcttctaaagtggg-3'
25	FlhD_50D	5'- ttatcgcatttctgcaatgcgtaatgccacattaatgtgaaggacat <b>gtgtaggctggagctgcttc-3'</b>
26	FlhD_50R	5'- ataatagataacaggctattatttcttttagaaacgctttattttac <b>catatgaatcctccttag-3'</b>
27	fliH_50D	5'- tggcggaaaccggcgaaatggtgattggcagcggcgaggatacct <b>gtgtaggctggagctgcttc-3'</b>
28	fliJ_50R	5'- gaccgcggctcatgctggtatcggtggtgatcagttggggcagggtga <b>catatgaatcctccttag-3'</b>
29	fliJ_CtrD	5'- ttattgtcgtcgtctggc-3'
30	fliH_CtrR	5'- tggcgttagcgtagacagtagat-3'

A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante foi realizada por meio da PCR com as concentrações de reagentes descritas na Tabela 3, utilizando-se um termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) com a seguinte programação: um ciclo de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 90 s; um ciclo final de alongação de 72 °C por 7 min e o resfriamento da amostra a 4 °C por 30 min. Ao final, os produtos de PCR de cada fragmento (total 250 µL por fragmento) foram colocados em um tubo plástico de 2 mL e precipitados com etanol segundo o

protocolo descrito por ZEUGIN & HARTLEY (1985). O DNA foi então suspenso em 20  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da eletroporação.

Tabela 3. Concentrações dos reagentes utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA recombinante.

Reagentes	Volume/tubo [ $\mu\text{L}$ ]:	Conc. estoque:	Conc. final:
Água:	40	-	-
<b>Tampão Klen</b>			
<b>contendo <math>\text{MgCl}_2</math>:</b>	<b>5</b>	<b>10x concentrado</b>	<b>1x concentrado</b>
<i>dNTP mix</i>			
(INVITROGEN:			
18427013):	1	10 mM	0,2 mM
<b>Iniciador de</b>			
<b>mutagênese 1:</b>	<b>1</b>	<b>10 pmol/<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>0.2 pmol/<math>\mu\text{l}</math></b>
Iniciador de	1	10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,2 pmol/ $\mu\text{l}$
mutagênese 2:			
<b><i>KlenTaq</i> (SIGMA</b>			
<b>ALDRICH: D6290):</b>	<b>1</b>	<b>5 U/<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>5 Unidades</b>
DNA plasmideal:	1	10 ng/ $\mu\text{L}$	0,02 ng/ $\mu\text{L}$
<b>Total por</b>	<b>50</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>microtubo:</b>			
Total de produto			
(em 5 microtubos):	250 $\mu\text{L}$		

Para eletroporação, foi utilizada uma mistura contendo 80  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de SE (aproximadamente  $1 \times 10^9$  bactérias / 80  $\mu\text{L}$ ) e 10  $\mu\text{L}$  da solução contendo DNA (plasmidial ou fragmentos de DNA recombinante). A eletroporação foi realizada em

eletroporador Gene Pulser Xcell (BIO-RAD), utilizando-se cubetas de 2 mm de largura, voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25  $\mu$ F e resistência de 200 m $\Omega$ .

#### 4.3.2 Transdução

O preparo dos mutantes (SG Fla+, SE  $\Delta$ *fliC* e SE  $\Delta$ *fliJ*) foi finalizado empregando-se a técnica de transdução com o bacteriófago  $\Phi$ P22 (WING, 1968; SAMBROOK & RUSSEL, 2001), multiplicado na estirpe SE. Preparou-se a cultura de SE em caldo nutriente (OXOID: CM0001) incubado a 37 °C/24 h em agitação. Dessa cultura, contendo aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL, transferiu-se 1 mL para tubo contendo 10 mL de caldo nutriente (OXOID: CM0001), juntamente com 1 mL de uma solução de bacteriófago, contendo cerca de  $1,0 \times 10^{10}$   $\Phi$ P22/mL. Após incubação a 37°C/24h em agitação, centrifugou-se a cultura a 4000 g por 25 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado (filtro Millipore 0,45 $\mu$ m) e procedeu-se a contagem em ágar nutriente com camada de SE.

As estirpes SE *flgLN* Cf<sup>r</sup> Kn<sup>r</sup>, SE *flhD* Cf<sup>r</sup>, SE  $\Delta$ *fliC* e SE  $\Delta$ *fliJ* foram cultivadas em 10mL de caldo nutriente com incubação a 37 °C/24 h estaticamente. As culturas apresentaram, em torno de  $5,0 \times 10^8$ UFC/mL. A essas culturas adicionou-se a solução do bacteriófago  $\Phi$ P22 na proporção de 0,03  $\Phi$ P22/1 bactéria. A mistura foi incubada a 37 °C/24 h em agitação. A seguir, centrifugou-se o cultivo a 4000 g/ 20 min/ 4 °C, filtrou-se o sobrenadante (filtro Millipore 0,45 $\mu$ m) e procedeu-se à contagem das placas de lise do  $\Phi$ P22 em ágar nutriente (OXOID: CM0003) com camada de SE. Posteriormente, a solução de bacteriófago cultivada em cada estirpe foi adicionada à cultura da bactéria receptora (SG ou SE) seguindo-se a proporção de 0,8  $\Phi$ P22/1 bactéria. Para a obtenção de bactérias em quantidade desejável, a cultura (10 mL de caldo nutriente) foi centrifugada a 4000 g/4 C°/20 min e o sedimento ressuspenso em 1 mL de caldo nutriente. A mistura foi incubada a 37 °C por 30min estaticamente e depois espalhada em placas de ágar nutriente (OXOID: CM0003) contendo cloranfenicol e/ou canamicina na concentração de 20  $\mu$ g/mL, que foram incubadas a 37 °C/24 h. Colônias emergentes

foram purificadas em ágar nutriente contendo discos de antibiogramas impregnados com canamicina (30 µg) e cloranfenicol (30 µg), sendo incubadas a 37 °C/24 h. As colônias foram ainda submetidas à técnica da PCR para confirmação dos resultados.

#### **4.3.3 Verificação da mutação nas estirpes de *Salmonella* spp.**

A verificação da mutação nas estirpes de *Salmonella* spp. foi realizada pela PCR das regiões do genoma onde os cassetes foram inseridos. Para cálculo do peso molecular dos *amplicons*, foram utilizados os softwares Artemis v11 (CARVER et al., 2005) e CLC *sequence viewer* 6.3 (CLC BIO), como descrito no APÊNDICE. O DNA genômico das estirpes mutantes foi extraído pelo método de fervura. A PCR foi realizada com três combinações de iniciadores: Direto controle + reverso controle, direto controle + C1 ou K1 (a depender do cassete que foi inserido) e reverso controle + C2 ou K2. A mutação em SG Fla+ também foi verificada com amplificação e sequenciamento do gene *flhA*. A Tabela 4 contém as concentrações de reagentes utilizadas para a amplificação dos fragmentos de DNA. A PCR foi realizada em termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) com a seguinte programação: um ciclo de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94° por 20 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 90 s; um ciclo final de alongação de 72 °C por 5 min e o resfriamento da amostra a 4 °C por 30 min.

Tabela 4. Concentrações dos reagentes utilizados na PCR para verificação da mutação.

Reagentes	Volume/tubo[ $\mu$ L]:	Conc. estoque:	Conc. final:
Água:	16	-	-
Tampão:	2.5	10x concentrado	1x concentrado
MgCl <sub>2</sub>	2	25 mM	1 mM
<i>dNTP mix</i> (INVITROGEN: 18427013):	1	10 mM	0,4 mM
Iniciador 1:	1	10 pmol/ $\mu$ L	0,4 pmol/ $\mu$ L
Iniciador 2:	1	10 pmol/ $\mu$ L	0,4 pmol/ $\mu$ L
<i>Taq DNA polimerase</i> (FERMENTAS: EP0402)	0.5	5 U/ $\mu$ L	2,5 Unidades
DNA:	1	10 ng/ $\mu$ L	0,4 ng/ $\mu$ L
Total:	25	-	-

Amostras dos *amplicons* foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação dos pesos moleculares (Aparelho: Consort E863, 600 V 250 mA, cuba Horizon 11-14 CE, Life Technology). Utilizou-se 90 mL de gel composto por agarose a 1%, diluída em solução tampão TAE (4,84 g de TRIS base, 1 mL de ácido acético glacial, 2 mL de EDTA 0,5 M e H<sub>2</sub>O qsp 1000mL, pH 8,0) acrescido de 9  $\mu$ L de solução aquosa a 1% de brometo de etídio (Sigma E-4391). As amostras, mais o marcador de tamanho molecular (1  $\mu$ L de DNA NEW ENGLAND BioLabs 1 Kb ou 1  $\mu$ L de DNA Gibco 1 Kb, 2  $\mu$ L de solução corante e 7  $\mu$ L água destilada) foram submetidos a uma corrente elétrica de 80 V por 1 h e 30 min. O gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado.



#### **4.4 Detecção de motilidade nas estirpes SG, SE, SG Fla+, SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta fliJ$**

A motilidade das estirpes SE, SG, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$  foi verificada em ágar semi-sólido contendo solução de caldo infusão de coração a 0,9 % (OXOID: CM1032) e 0,25 % de ágar nutriente (OXOID: CM0003). Após a esterilização, o ágar foi despejado em placas de Petri. Utilizando-se uma agulha estéril, as colônias das estirpes mutantes e selvagens (SE e SG) foram inoculadas na superfície do ágar que foi então incubado a 37 °C/24 h. Para indução e verificação de motilidade do tipo *swarming*, SG Fla+ foi inoculado na superfície de um ágar semi-sólido contendo 0,9 % de caldo infusão de coração (OXOID: CM1032) e 0,5 % de ágar nutriente (OXOID: CM0003).

#### **4.5 Verificação da presença de flagelos nas estirpes SG, SE, SG Fla+, SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta fliJ$**

A presença de flagelo foi verificada com utilização do teste de soro-aglutinação rápida em placa com anticorpo anti-flagelo para os antígenos g e m (REMEL: 30161201 - ZD15) presentes em SE e também por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, 15  $\mu$ L da cultura (incubada a 37 °C/24 h em agitação) de cada estirpe foram colocados em grades de microscopia eletrônica (AGAR SCIENTIFIC), onde permaneceram por 5 minutos para decantação das células. O excesso de células foi retirado com ajuda de papel filtro e as grades coradas com uma solução a 1 % de acetato de uranila (EMS: 22400) por 1 min. O corante foi removido e as grades visualizadas em microscópio JEOL JEM 1010, operando na voltagem de 100 Kv e magnificação de 15.000 vezes.

#### 4.6 Quantificação da expressão do gene *fliC* *in vitro* em várias estirpes de *Salmonella* spp.

Para quantificação da expressão do gene *fliC*, utilizou-se a técnica da PCR em tempo real com o sistema de sondas *taq-man*. O gene 16S foi escolhido como gene referência. A expressão do gene *fliC* foi induzida *in vitro* com lisofosfolípídeos naturalmente presentes no soro fetal bovino (SUBRAMANIAN & QADRI, 2006).

Para isso, as estirpes de *Salmonella* utilizadas (ST, SG, SE, SP, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ ) foram inoculadas em recipiente contendo 50 mL de caldo nutriente e incubadas a 37 °C em agitação. Duas amostras de 10 mL de cada uma das culturas, colhidas na metade da fase logarítmica da curva de multiplicação, contendo cerca de  $1,0 \times 10^8$  bactérias/mL foram colocadas em tubos *falcon* de 15 mL que foram então centrifugados a 4000 g/10 min a 4 °C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de água ultrapura. Esse procedimento (lavagem com água ultrapura) foi repetido por três vezes. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 0,9 mL de PBS. Em uma das amostras de cada cultura adicionou-se 100  $\mu$ L de soro fetal bovino e na outra, 100  $\mu$ L de PBS. Todas as amostras foram incubadas a 37 °C/60 min. Após a incubação, realizou-se a extração do RNA com o *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* (QIAGEN: 74524), seguindo o protocolo de extração de número 4 (digestão bacteriana com lise enzimática e proteinase K). O ensaio foi repetido três vezes.

A quantidade e qualidade dos RNAs extraídos foram aferidas em espectrofotômetro *NanoDrop* 1000 (THERMO SCIENTIFIC: ND1000). A seguir, 5  $\mu$ g de cada amostra foram utilizados para a produção de cDNA pela reação da *transcriptase* reversa, conforme o manual do *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (ROCHE: 04896866001). A quantidade de cDNA foi aferida no NanoDrop-1000. As sequências dos genes *fliC* e 16S foram obtidas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). As sondas e iniciadores foram desenhados no *Universal ProbeLibrary Assay Design Center*

disponível no endereço eletrônico: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>. Como a sequência do gene *fliC* em ST era diferente das demais estirpes (SP, SG, SE, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ ), um par de iniciadores e uma sonda foram desenhados especificamente para esse sorovar (Tabela 5).

Tabela 5. Iniciadores e sondas utilizadas para avaliação da expressão do gene *fliC* em ST, SG, SE, SP, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ .

Gene	Iniciador direto	Iniciador reverso	Sonda	Nº de acesso (NCBI)
<i>fliC</i>	5'-ggcgtaagtagcattaatcaatgaagac-3'	5'-attgaagccagtggttagc-3'	142	6949105
<i>fliC</i> (ST)	5'-gaggctaaagccgcattg-3'	5'-catcttaacaacagatgctgtgc-3'	62	1254294
<b>16S</b>	5'-ttggtgaggtaacggctca-3'	5'-gctggatcatcctctcagacc-3'	141	6950714

O termociclador *LightCycler* 480 (LC 480) (ROCHE) com capacidade para a leitura de placas de 96 poços foi utilizado para a PCR. Para a amplificação do cDNA, uma mistura comercial contendo a enzima *taq-polimerase*, dNTPs e tampões (*LightCycler 480 Probes master*, ROCHE: 04707494001) foi utilizada. A amostra era composta de 10  $\mu$ L da mistura (*taq-polimerase*, DNTps e tampões), 0,2  $\mu$ L de sonda (1 pmol), 4,8  $\mu$ L de água ultrapura, aproximadamente 4  $\mu$ L de cDNA (50 ng) e 1  $\mu$ L dos iniciadores (0,05 pmol) *direto* e *reverso*, totalizando 20  $\mu$ L por reação. Em cada ensaio, a PCR das amostras de cDNA foi realizada em triplicata. Utilizando-se o seguinte programa: Um ciclo de 95 °C por 10 min, 45 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 s e um ciclo final de 40 °C por 30 s.

Para o cálculo das curvas padrão foram utilizados cDNAs gerados a partir de amostras de RNA de culturas de SE e ST, estimuladas com soro fetal bovino. Para cada combinação de iniciadores e sondas foi construída uma curva padrão. Como controle negativo (CN) da reação, realizou-se a PCR sem a presença de cDNA.

Os dados da expressão gênica foram calculados por meio do método de quantificação relativa (PFAFFL, 2001). A expressão de cada gene alvo foi calculada relativamente à expressão do gene referência. Para visualização dos resultados, construiu-se gráficos (para cada estirpe) nos quais os valores normalizados da expressão do gene *fliC* antes da indução com soro fetal bovino foram considerados basais e comparados com os valores da expressão do gene após a indução.

#### **4.7 Infecção de células com estirpes de *Salmonella* spp. e quantificação da expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune**

Células extraídas de rins de pintainhos e macrófagos de galinhas de uma linhagem de multiplicação contínua denominada HD11 em cultivo foram infectadas com as estirpes SE, SP e SG, SG Fla+, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ . Realizou-se a contagem bacteriana no interior das células duas, seis e 24 h após a infecção (hpi). A expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune foi mensurada seis hpi.

##### **4.7.1 Padrão de multiplicação das estirpes**

Curvas de multiplicação para as diferentes estirpes foram geradas utilizando-se dois métodos simultâneos: a contagem de colônias viáveis (UFC/mL) e espectrofotometria (600 nm de comprimento de onda). As curvas foram utilizadas para determinar as taxas de multiplicação de cada estirpe. Gráficos de calibração correlacionando densidade óptica (DO) e a contagem ( $\log_{10}$ ) foram construídos e empregados para cálculo da dose infectante durante a infecção das células.

#### **4.7.2 Células de rins de galinhas (CRGs)**

CRGs foram retiradas de rins de pintainhos da linhagem Ross 308 com uma semana de vida, conforme protocolo descrito por BARROW & LOVELL (1989). Adicionou-se 1 mL de suspensão de células contendo  $1 \times 10^6$  células/mL em cada um dos 24 poços de placas para cultivo celular, as quais foram incubadas a 37°C/72h com 5 % de CO<sub>2</sub>. Utilizou-se o meio *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) completo, adicionado com 12,5 % de soro fetal bovino, 10 % de caldo fosfato de triptose (SIGMA-ALDRICH: T8159), 25 unidades (U) de nistatina (SIGMA-ALDRICH: N6261) por mL, 100 U de penicilina/mL e 20 µg de streptomomicina/mL.

#### **4.7.3 Macrófagos de galinhas (HD11)**

Macrófagos de galinhas de uma linhagem de multiplicação contínua denominada HD11 foram cultivados conforme descrito por KAISER et al. (2000). Primeiramente, 1 mL da suspensão de HD11, contendo  $4 \times 10^5$  células/mL, foi semeado em cada um dos 24 poços das placas para cultivo celular (NUNC: 142475), que foram em seguida incubadas a 41°C/48h com 5 % de CO<sub>2</sub>. Para cultivo utilizou-se o meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH: R8758), contendo 20 mM de L-glutamina, 2,5 % de soro fetal bovino, 2,5 % de soro de galinha, 10 % de caldo fosfato de triptose (SIGMA ALDRICH: T8159), 100 U de penicilina por mL e 20 µg de estreptomomicina por mL.

#### **4.7.4 Infecção das células e contagem intracelular das estirpes de *Salmonella* spp.**

Para infecção das células (CRGs e HD11), 1 mL da cultura (preparada a 37°C/24h em agitação) de cada estirpe foi inoculado em frascos contendo 100 mL de caldo nutriente, os quais foram incubados a 37°C por aproximadamente duas h em agitação. As bactérias foram ressuspensas em PBS, de acordo com a dose infectante a qual foi calculada pela mensuração da DO das culturas bacterianas (a 600 nm). As

infecções foram realizadas utilizando-se 10 bactérias por célula. As células infectadas foram incubadas a 41 °C/24 h. As contagens bacterianas intracelulares foram realizadas 2, 6 e 24 hpi, utilizando-se o ensaio de proteção com gentamicina conforme descrito por JONES et al. (2001) e SMITH et al. (2005). Para isso, a monocamada de células foi lavada três vezes com PBS pré-aquecido e então lisadas com a adição de 100 µL da solução a 1 % de Triton X-100 (FISHER SCIENTIFIC: 807423) em PBS. As contagens foram determinadas em placas de Petri contendo ágar nutriente. Os valores obtidos em UFC/mL foram convertidos em log<sub>10</sub>. O ensaio para contagem bacteriana intracelular foi repetido quatro vezes.

#### **4.7.5 Quantificação da expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune em células de cultivo após infecção por estirpes de *Salmonella* spp.**

##### **4.7.5.1 Extração de RNA e síntese de cDNA**

Para a quantificação da expressão dos genes responsáveis por mediadores da resposta, o RNA total foi extraído das células (HD11 ou CRGs) seis hpi conforme o manual do *Nucleospin RNA II Kit* (MACHEREY-NAGEL: 740955.50). Em seguida, a quantidade e qualidade do RNA nas amostras foram aferidas utilizando-se o aparelho *NanoDrop* 1000 e em seguida mantidas a – 80 °C. Os cDNAs foram sintetizados pela reação da transcriptase reversa a partir de amostras de 1 µg de RNA, de acordo com o manual do *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (ROCHE APPLIED SCIENCE, UK). Os cDNAs resultantes foram quantificados no *NanoDrop* 1000 e posteriormente mantidos a - 20 °C até momento da realização da PCR em tempo real.

#### 4.7.5.2 Quantificação da expressão gênica

Nos CRGs foi mensurada a expressão de genes responsáveis por iNOS, CXCLi1, IL-6, CXCLi2 e TLR-5. Em células da linhagem HD11 foi quantificada a expressão dos genes responsáveis por óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fator de necrose alfa induzido por lipopolissacarídeos (LITAF), MIP-1 $\beta$  (CCLi2), IL-1  $\beta$ , CXCLi1 (K60), CXCLi2 (IL-8), IL-4, INF-  $\gamma$ , IL-6, IL-12  $\beta$ , IL-10 e IL-13, IL-18, TLR-4 e TLR-5.

As sequências dos iniciadores e sondas para quantificação do gene referência (28S) e dos genes responsáveis por iNOS, CXCLi1, IL-6, CXCLi2, INF-  $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13 haviam sido previamente descritas (KAISER et al., 2000; AVERY et al., 2004; WITHANAGE et al., 2004) e foram novamente testadas *in silico*. Os iniciadores e as sondas para quantificação de genes responsáveis por LITAF, IL-12  $\beta$ , IL-18, MIP-1 $\beta$ , TLR-4 e TLR-5 foram desenhados a partir das sequências dos respectivos genes obtidas na base de dados ensembl (<http://www.ensembl.org>) e com auxílio da plataforma para construção de sondas da Roche (<https://www.roche-applied-science.com/new/customprobes.jsp>). As sequências dos iniciadores e sondas utilizados estão na Tabela 6.

A PCR em tempo real foi realizada no LC 480, utilizando-se o *Light Cycler 480 Probes Master kit* (ROCHE: 04707494001). O programa utilizado foi: Um ciclo de 95 °C por 10 min; 45 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 s e um ciclo final de 40 °C por 30 s. Para a PCR em tempo real, utilizou-se placas de 96 poços; 20  $\mu$ L de uma mistura foram adicionados, por poço. A mistura consistiu de 10  $\mu$ L dos reagentes do *Cycler 480 Probes Master kit* (ROCHE: 04707494001), 300 nM dos iniciadores direto, 300 nM dos iniciadores reverso, 100 nM da respectiva sonda, 2  $\mu$ L do cDNA e o volume foi elevado até 20  $\mu$ L com água livre de DNase. Para a PCR utilizou-se, controle negativo (sem DNA molde), controle positivo (cDNA de células estimuladas com LPS), as amostras testadas (cDNA das células infectadas com as diferentes estirpes) e células não infectadas. O cDNA de células estimuladas com LPS foi utilizado para geração das curvas padrão. Foram utilizadas três replicas biológicas das amostras

testadas as quais foram analisadas em triplicata. Os dados da expressão gênica foram convertidos em valores normalizados, utilizando-se o método de quantificação relativa (PFAFFL, 2001). As médias da expressão de cada gene induzidas por cada estirpe nos três ensaios foram agrupadas em gráficos com barras.

Tabela 6. Sequências de sondas (P), iniciadores direto (D) e reverso (R) utilizados para quantificação da expressão dos genes responsáveis por mediadores da resposta imune.



RNA alvo	Sonda e iniciadores*	Sequência	Número de acesso no Ensembl
28S	P D R	5'-(FAM)-aggaccgctacggacctccacca-(TAMRA)-3' 5'-ggcgaagccagaggaaact-3' 5'-gacgaccgattgcacgtc-3'	X59733
IL-6	P D R	5'-(FAM)-aggagaaatgcctgacgaagctctcca-(TAMRA)-3' 5'-gctcgccggcttcga-3' 5'-ggtaggtctgaaaggcgaacag-3'	AJ250838
CXCLi1	P D R	5'-(FAM)-ccacattctgacgtgaggtccgct-(TAMRA)-3' 5'-ccagtcatagagactcattccaaa-3' 5'-tgccatcttcagagtagctatgact-3'	AF277660
CXCLi2	P D R	5'-(FAM)-tctttaccagcgtcctacctgcgaca-(TAMRA)-3' 5'-gccctcctcctggttcag-3' 5'-tggcaccgcagctcatt-3'	AJ009800
iNOS	P D R	5'-(FAM)-tccacagacatacagatgccctcctctt-(TAMRA)-3' 5'-ttggaaccaaaagtgtgtaatatcttg-3' 5'-ccctggccatcgctacat-3'	U46504
IFN- $\gamma$	P D R	5'-(FAM)-tggccaagctcccgatgaacga-(TAMRA)-3' 5'-gtgaagaagtgaaagatatcatgga-3' 5'-gctttgcgctggattctca-3'	Y07922
IL-4	P D R	5'-(FAM)-agcagcacctccctcaaggcacc-(TAMRA)-3' 5'-aacatcgctcagctcctgaat-3' 5'-tctgctaggaactctccattgaa-3'	AJ621735
IL-13	P D R	5'-(FAM)-cattgcaagggacctgcactcctctg-(TAMRA)-3' 5'-caccagggcatccagaa-3' 5'-tccgatcctgaaagccactt-3'	AJ621735
IL-10	P D R	5'-(FAM)-cgacgatcggcgctgtca-(TAMRA)-3' 5'-catgctgctggcctgaa-3' 5'-cgtctccttgatccttgatg-3'	AJ621614
LITAF	P D R	5'-(FAM)-tggggcc-(TAMRA)-3' 5'-gagcgttgacttgctgtc -3' 5'-aagcaacaccagctatgcac -3'	NM_204267
IL-18	P D R	5'-(FAM)-ggaaggag-(TAMRA)-3' 5'-agagcatgggaaaatggttg-3' 5'-ccaggaatgtcttgggaac-3'	AJ276026
MIP-1 $\beta$	P D R	5'-(FAM)-tcctgctg-(TAMRA)-3' 5'-tgccatctgctaccagacct-3' 5'-gccgggagatgtagtga-3'	AJ243034
IL-12	P D R	5'-(FAM)-tgatgagc-(TAMRA)-3' 5'-agcacaagaaatacaaaagcaag-3' 5'-gtctttggcccagcttttg-3'	AJ564201
TLR4	P D R	5'-(FAM)-cctggagg-(TAMRA)-3' 5'-actctggggtgctgctg-3' 5'-gtgcatctgaaagctgtgct-3'	NM_001030693
TLR5	P D R	5'-(FAM)-catcacca-(TAMRA)-3' 5'-gggcattgtttgtctgt-3' 5'-ggtggatggctcctatcaa-3'	NM_001024586

## **4.8 Ensaio *in vivo*. Avaliação da patogenicia**

O ensaio *in vivo* seguiu o modelo adotado por FREITAS NETO et al. (2007) e foi realizado no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - campus de Jaboticabal.

### **4.8.1 Aves**

No ensaio *in vivo* foram utilizadas aves de linhagem comercial para postura de ovos vermelhos. No momento da chegada, foram colhidas amostras de mecônio do interior das caixas de transporte para pesquisa de *Salmonella* spp., conforme a metodologia descrita por ZANCAN et al. (2000). As aves foram criadas em baterias, em ambiente climatizado, recebendo água e ração *ad libitum*.

### **4.8.2 Delineamento experimental**

As aves foram separadas em grupos de acordo com a estirpe e a dose utilizadas. Para cada estirpe (SG Fla+ e SG selvagem) foram utilizados dois grupos contendo 30 aves cada, totalizando quatro grupos (A, B, C e D). Aves de um grupo receberam oralmente 0,5 mL de uma cultura contendo aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/ mL, preparada em caldo nutriente (OXOID: CM0001) e incubada a 37 °C/24 h em agitação. Aves do outro grupo receberam a mesma cultura diluída a  $10^{-2}$ . A inoculação foi realizada no quinto dia de vida.

### **4.8.3 Avaliação dos sinais clínicos, mortalidade, alterações macroscópicas e pesquisa das estirpes em fígado, baço e conteúdo cecal**

As aves foram observadas durante quatro semanas, registrando-se os sinais clínicos e a mortalidade. As sobreviventes foram submetidas à eutanásia para a avaliação das alterações macroscópicas em fígado, baço e parede do ceco e pesquisa microbiológica em fígado, baço e conteúdo cecal.

Os exames bacteriológicos consistiram de suabe do parênquima hepático e esplênico e do conteúdo cecal, que foram semeados em ágar verde-brilhante (OXOID:CM0263), contendo ácido nalidíxico (25 µg/mL) e novobiocina (1 µg/mL) (VB NaINov). Em seguida, os suabes foram submersos em 2 mL de caldo selenito (OXOID:CM0395), acrescido de novobiocina (0,04 %) (SN) e incubados a 37 °C/24 h. Na ausência de crescimento, o suabe foi novamente semeado em VB NaINov e incubado nas mesmas condições.

## **4.9 Análise dos resultados**

A análise estatística foi conduzida com a ajuda do software Statistica versão 10 (STATSOFT). As médias dos valores da expressão gênica foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Para a comparação das médias das contagens das estirpes de *Salmonella* spp. no interior das células HD11 e CRG também utilizou-se o teste de Tukey a 5 %. As taxas de mortalidade foram comparadas entre si pelo teste exato de Fisher.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Análise das sequências dos genes envolvidos na produção do flagelo em SG e SE

Após a comparação dos genes responsáveis pela síntese do flagelo distribuídos nos quatro *loci*, identificou-se a presença de cinco pseudogenes em SG (Tabela 7 e Figura 4). As causas da perda de função gênica foram a presença de código de parada e a perda de fragmentos da sequência.

Tabela 7. Genes responsáveis pela síntese de flagelo em SE e SG.

<b>Locus</b>	<b>Genes</b>
<b>I</b>	<i>flgN, flgM, flgA, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI<sup>▲</sup>, flgJ, flgK<sup>▲</sup>, flgL</i>
<b>II</b>	<i>flhE, flhA<sup>▲</sup>, flhB<sup>▲</sup>, cheZ, cheY, cheB, cheR, tapE, cheM<sup>▲</sup>, cheW, cheA, motB, motA, flhC, flhD</i>
<b>III a</b>	<i>fliY, fliZ, fliA, fliB, fliC, fliD, fliS, fliT</i>
<b>III b</b>	<i>fliE, fliF, fliG, fliH, fliI, fliJ, fliK, fliL, fliM, fliN, fliO, fliP, fliQ, fliR</i>

▲Pseudogene em SG

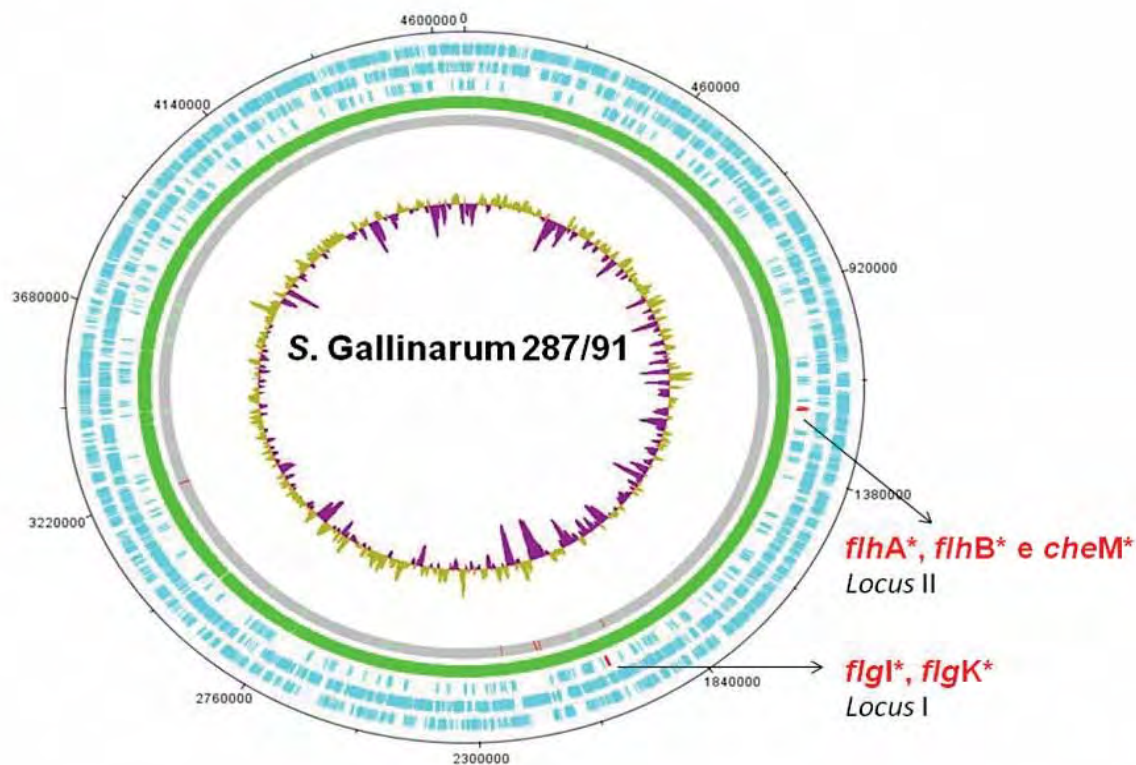


Figura 4. Visualização do genoma de SG no software Artemis v11. Setas indicam a posição dos pseudogenes nos *loci* I e II.

## 5.2 Verificação da mutação nas estirpes de *Salmonella* spp.

Na construção do mutante SG Fla+, primeiramente, duas estirpes de SE foram produzidas: SE *flgLN* Cf<sup>r</sup> Kn<sup>r</sup> (marcação do *locus* I) e SE *flhD* Cf<sup>r</sup> (marcação do *locus* II). Os produtos da PCR da estirpe SE *flgLN* Cf<sup>r</sup> Kn<sup>r</sup> estão disponíveis nas Figuras 5 e 6. A amplificação do fragmento adjacente ao gene *flgN*, com os iniciadores *flgN* ctrF x K1, *flgN* ctrR x K2 e *flgN* ctrF x *flgN* ctrR de três colônias mutantes, demonstrou que Kn<sup>r</sup> foi inserido no local desejado. A PCR do fragmento próximo ao gene *flgL* com os iniciadores *flgL* ctrF x C1, *flgL* ctrR x C2 e *flgL* ctrF x *flgL* ctrR de duas colônias mutantes, demonstrou que Cf<sup>r</sup> foi corretamente inserido. A marcação do *locus* II na

região adjacente ao *flhD* também foi bem sucedida (Figura 7). A PCR desta região com os iniciadores *flhD* ctrF x C1 e *flhD* ctrR x C2 produziu vários produtos inespecíficos e por isso não foi mostrada.

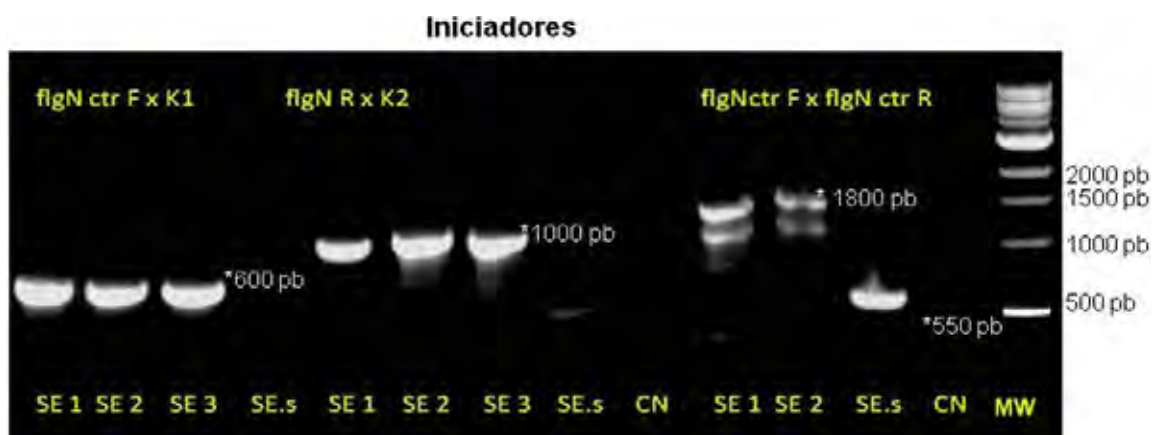


Figura 5. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR da região adjacente ao gene *flgN* com diferentes combinações de iniciadores. SE 1, 2, 3: colônias de SE  $Kn^f$ . SE.s: Estirpe de SE antes da inserção  $Kn^f$ . CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).

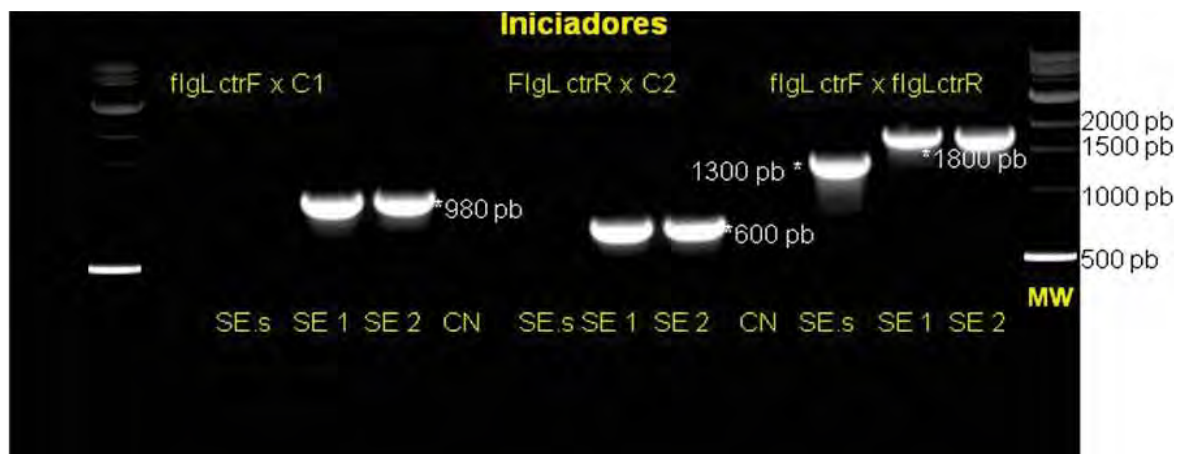


Figura 6. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR da região adjacente ao gene *flgL* com diferentes combinações de iniciadores. SE 1 e 2: colônias de SE  $Cf^f$ . SE.s: Estirpe de SE antes da inserção  $Cf^f$ . CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).

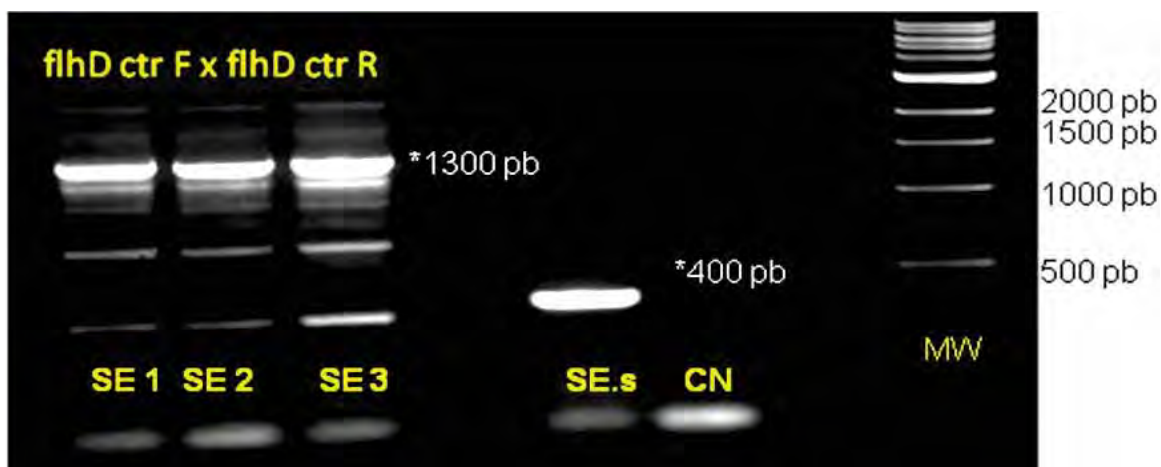


Figura 7. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR da região adjacente ao gene *flhD*. SE 1, 2 e 3: colônias de SE Cf<sup>r</sup>. SE.s: Estirpe selvagem. CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).

Os *loci* I e II dos genes relacionados à produção do flagelo do genoma de SG foram substituídos por *loci* homólogos de SE. Primeiramente, SG recebeu o *locus* II, marcado com Cf<sup>r</sup> na região adjacente ao gene *flhD* (Figura 8). O gene *flhA*, último pseudogene do *locus* II em SG, possuía um código de parada (TAA) no nucleotídeo de posição 994. Três das sete colônias de SG marcadas na região adjacente ao *flhD* tiveram parte do gene *flhA* sequenciada (Figuras 9 e 10). Em seguida, Cf<sup>r</sup> foi eliminado de uma das colônias de SG e então a mesma recebeu o *locus* I marcado com Cf<sup>r</sup> e Kn<sup>r</sup> (Figuras 11 e 12). A amplificação das regiões adjacentes aos *loci* I e II comprovou a inserção dos cassetes nos locais desejados.

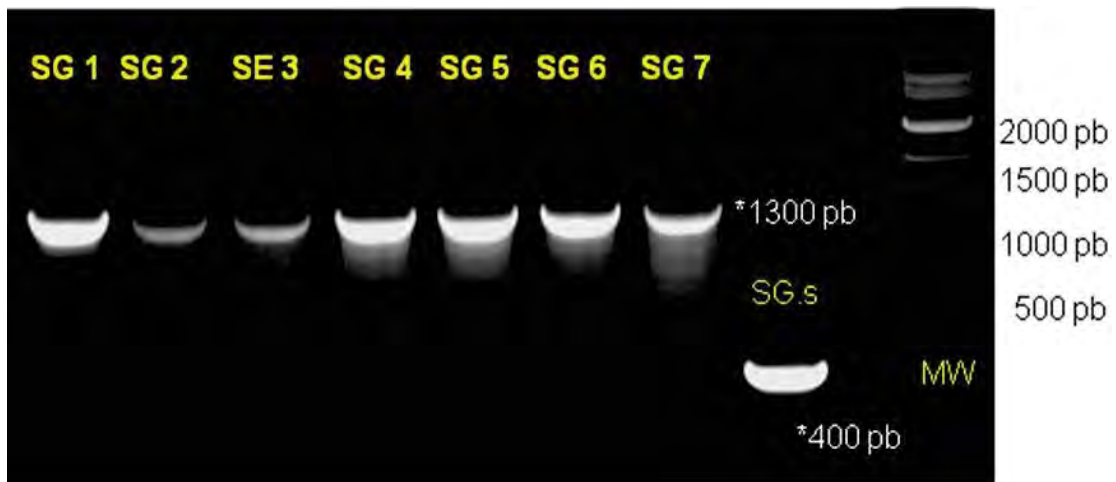


Figura 8. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR da região adjacente ao gene *flhD*. SG 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 colônias de SG Cf<sup>r</sup>. SG.s: Estirpe selvagem. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).



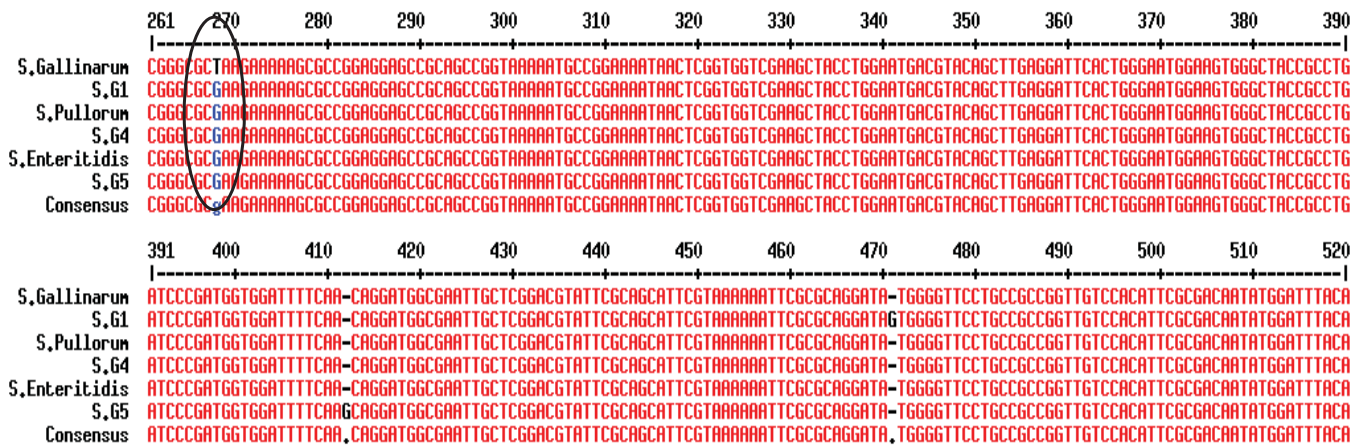


Figura 9. Parte da sequência do gene *flhA* (fita simples 5'-3'). O círculo indica o local do código de parada em SG.

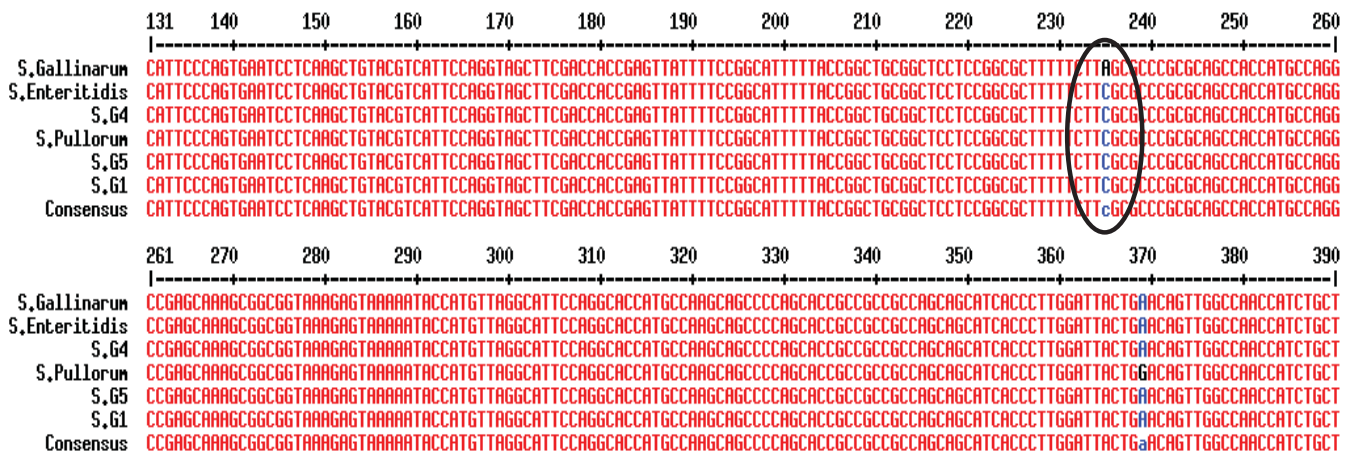


Figura 10. Parte da sequência do gene *flhA* (fita complementar). O círculo indica o local do código de parada em SG.

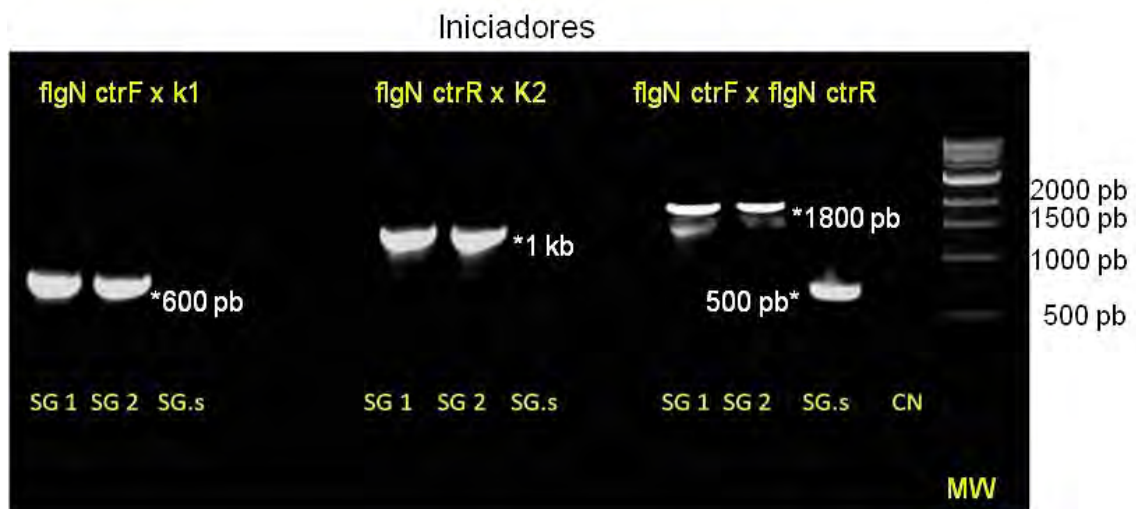


Figura 11. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR da região adjacente ao gene *flgN* com diferentes combinações de iniciadores. SG 1 e 2: colônias de SG  $Kn^r$ . SG.s: Estirpe selvagem. CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).

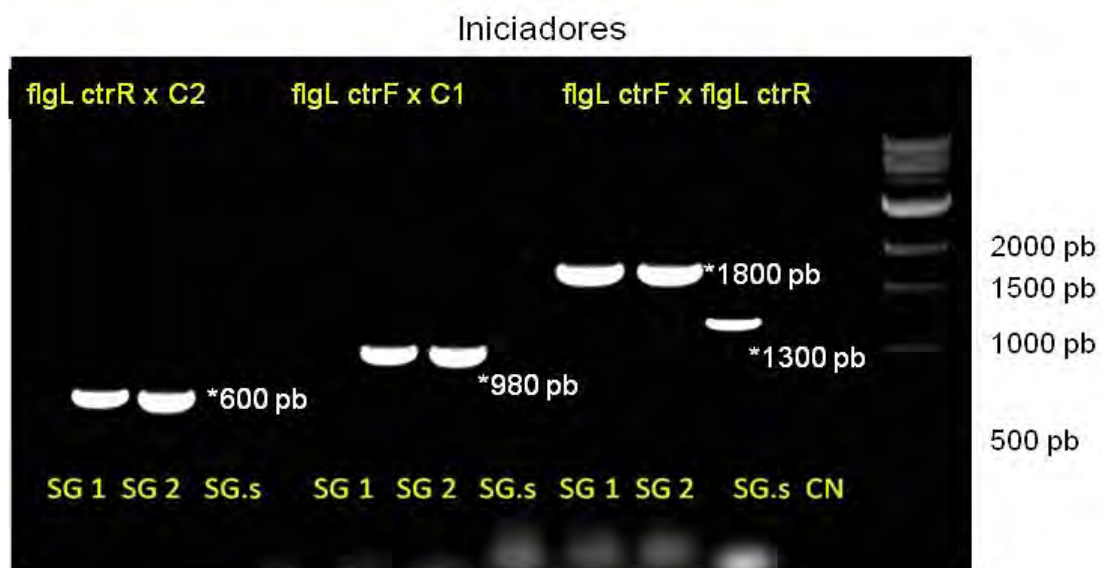


Figura 12. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR da região adjacente ao gene *flgL* com três combinações de iniciadores. SG 1 e 2: colônias de SG  $Cf^r$ . SG.s: Estirpe selvagem. CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).

Foram também produzidos dois mutantes de SE; em um deles substituiu-se o gene *fliC* (Figura 13) por  $Cf^f$  e, no outro, o  $Cf^f$  foi inserido no gene *fliJ* (Figura 14). Os amplicons obtidos a partir da PCR dos dois genes, com três combinações de iniciadores, comprovaram a correta inativação.

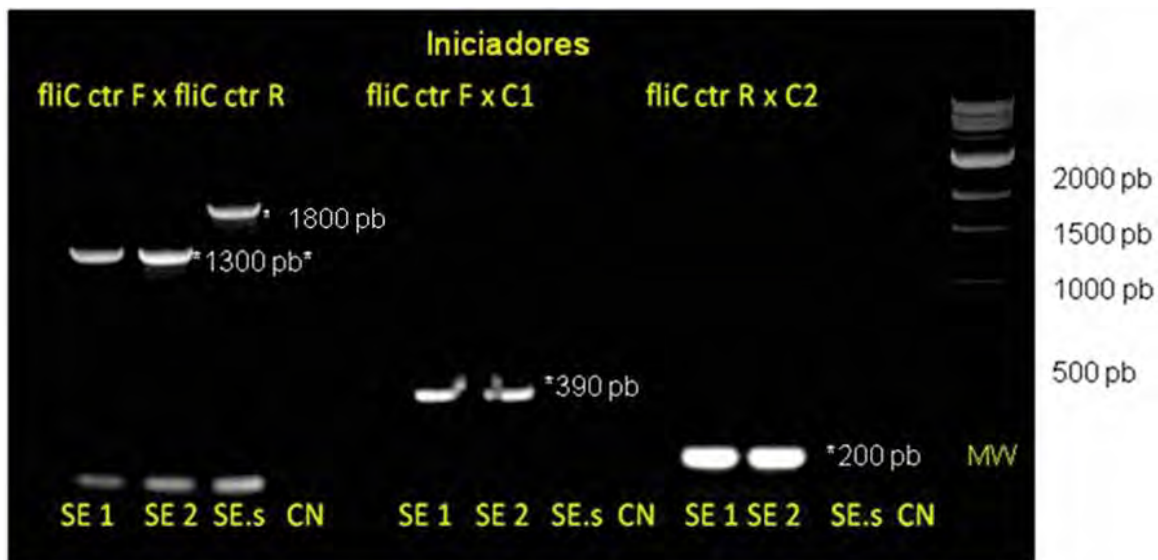


Figura 13. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR do gene *fliC* com três combinações de iniciadores. SE 1 e 2: colônias de SE  $Cf^f$ . SE.s: Estirpe selvagem. CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).

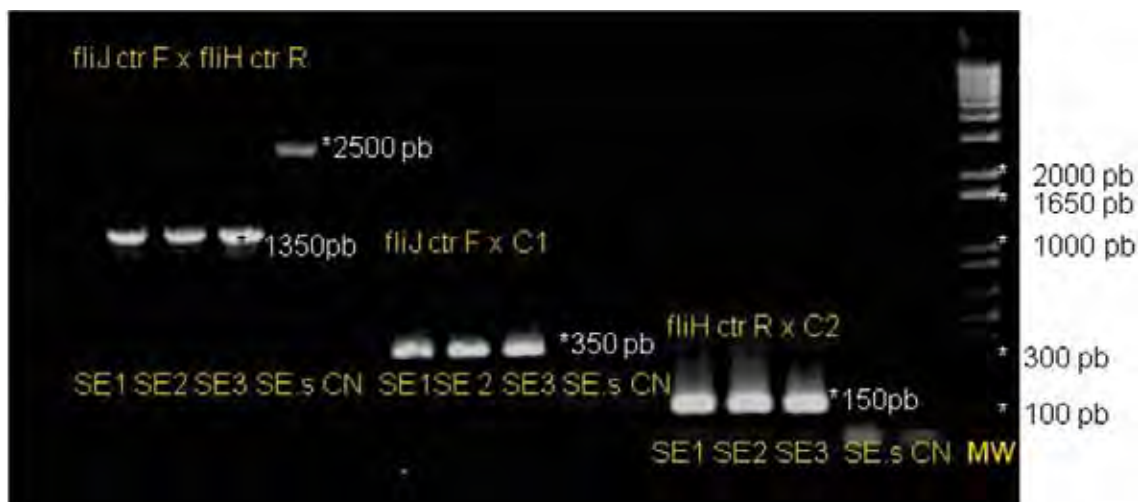


Figura 14. Eletroforograma em agarose 1 %. Produtos da PCR do gene *fliJ* com três combinações de iniciadores. SE 1, 2 e 3: colônias de SE Cf<sup>r</sup>. SE.s: Estirpe selvagem. CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1Kb plus DNA Ladder Gibco).

### 5.3 Verificação de motilidade nas estirpes SG, SE, SG Fla+, SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta fliJ$

As estirpes SE e SG Fla+ demonstraram motilidade quando inoculadas em ágar semi-sólido, enquanto que SG, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$  não produziram nenhum crescimento na superfície do ágar (Figura 15).

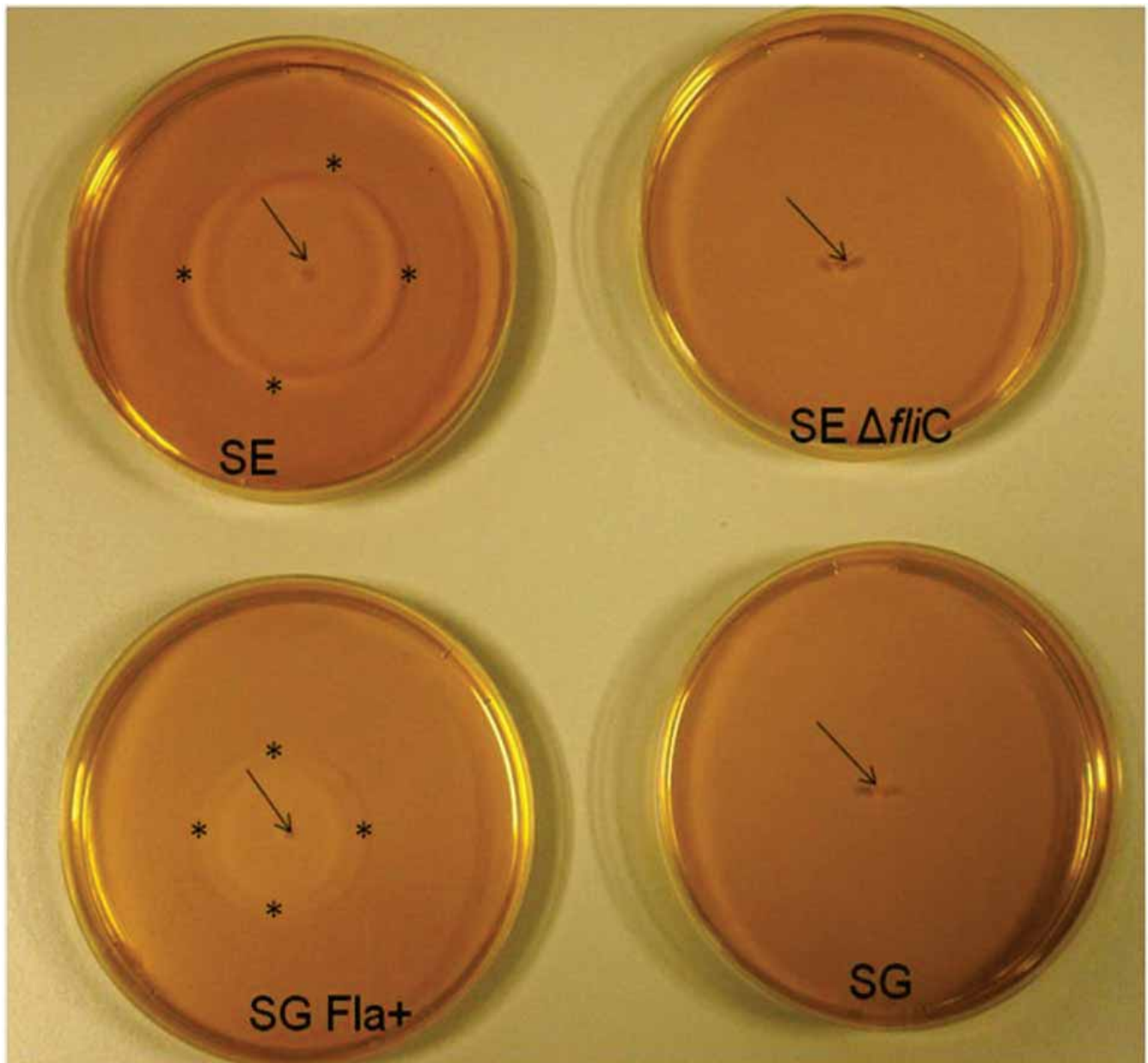


Figura 15. Fotografia de ágar semi-sólido inoculado com estirpes de *Salmonella* spp. após incubação por 12h/37°C. Setas indicam ponto de inoculação da bactéria. Borda do halo de multiplicação demarcada por asterisco indica motilidade (SE e SG Fla+). O teste de SE  $\Delta fliJ$  não foi mostrado.

#### 5.4 Verificação da presença de flagelos nas estirpes SG, SE, SG Fla+, SE $\Delta fliC$ e SE $\Delta fliJ$

O teste de soro-aglutinação demonstrou a presença de flagelos em SE e SG Fla+, que foi confirmado por microscopia eletrônica de transmissão. Da mesma maneira, as estirpes negativas na sorologia (SG, SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$ ), demonstraram ausência de flagelos na microscopia (Figuras 16, 17, 18 e 19).

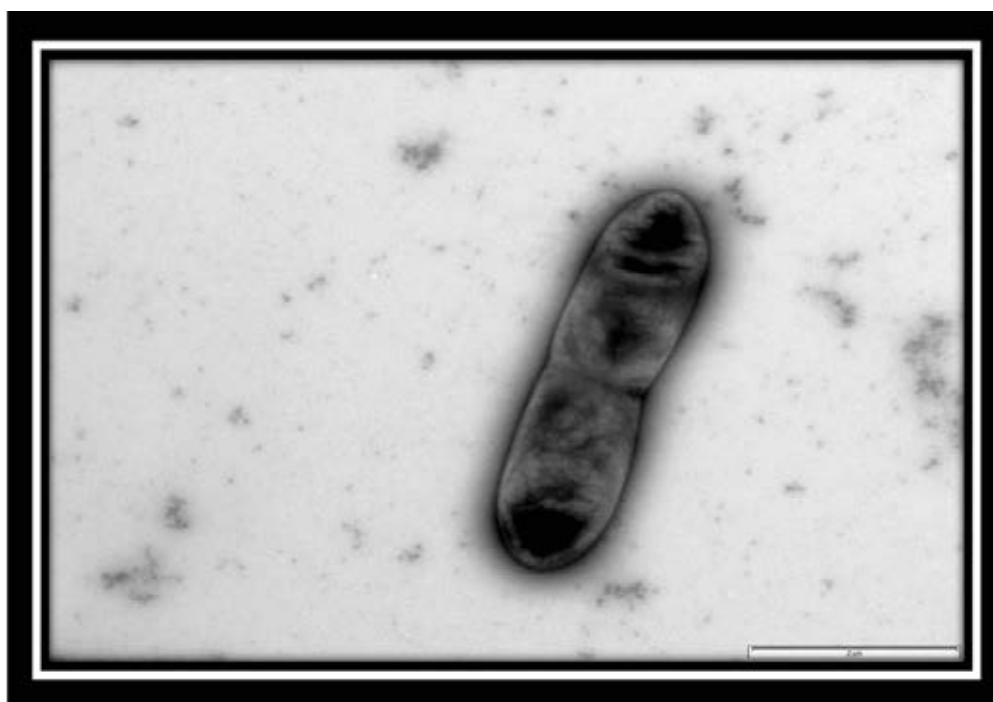


Figura 16. Eletromicrografia de SG em cultura. Notar a ausência de flagelos. As eletromicrografias de SE  $\Delta fliC$  e SE  $\Delta fliJ$  não foram mostradas. Acetato de uranila 1 %, 15000 x, barra = 2  $\mu$ m.

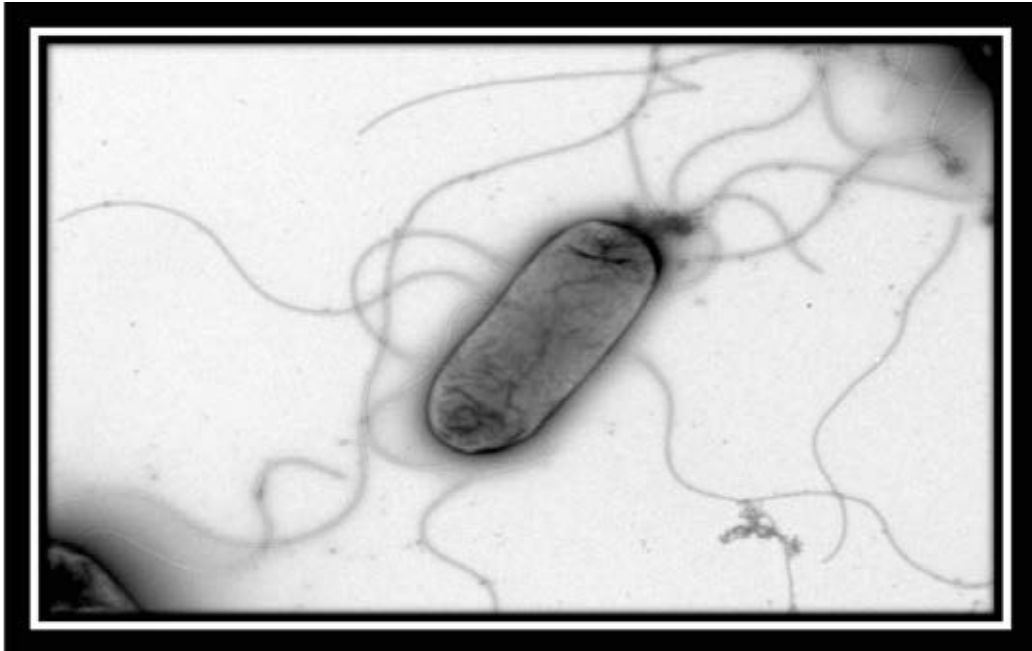


Figura 17. Eletromicrografia de SE em cultura. Notar a presença de flagelos. Acetato de uranila 1 %, 15000 x.



Figura 18. Eletromicrografia de SG Fla+ em cultura. Notar a presença de flagelos. Acetato de uranila 1 %, 15000 x, barra = 2  $\mu\text{m}$ .



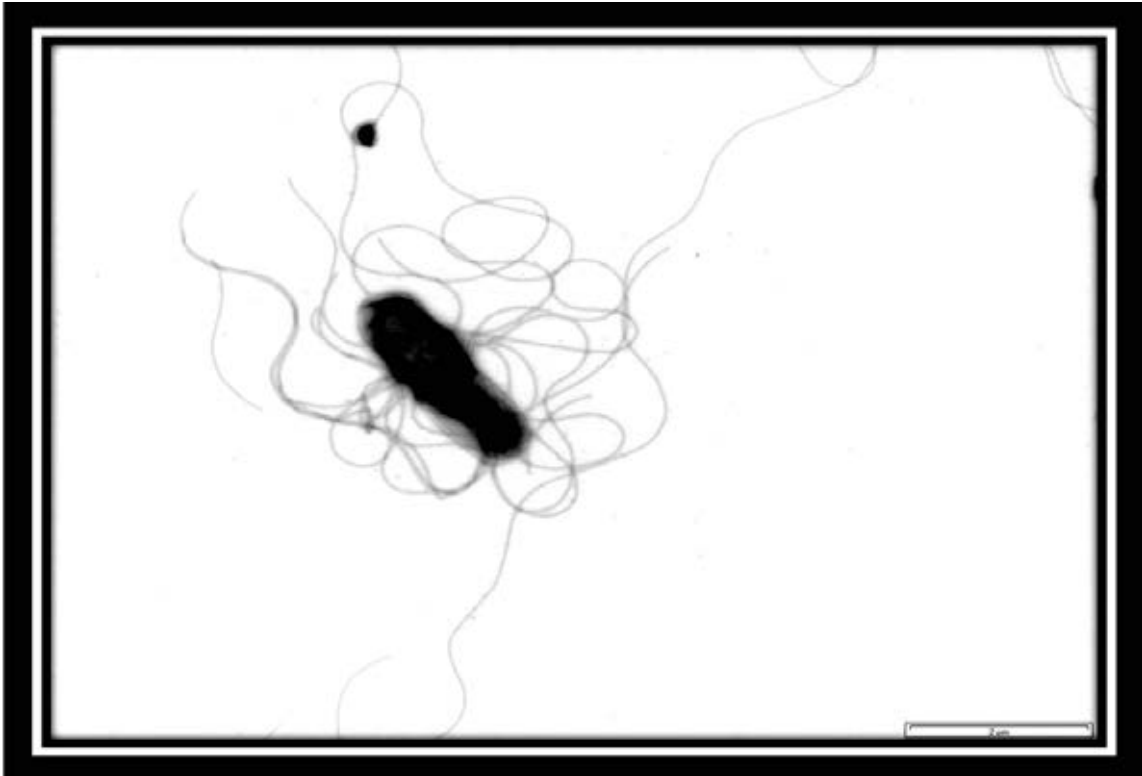


Figura 19. Eletromicrografia de SG Fla+ cultivada em ágar semi-sólido para motilidade do tipo *swarming*. Notar a presença de muitos flagelos. Acetato de uranila 1 %, 15000 x, barra = 2  $\mu$ m.

### 5.5 Expressão do gene *fliC* *in vitro* em várias estirpes de *Salmonella* spp.

A expressão do gene *fliC* *in vitro* nas diferentes estirpes de *Salmonella* spp. foi induzida com lisofosfolídeos e comparada com a expressão do mesmo gene sem a presença de lisofosfolídeos. A média dos resultados da expressão (em valores normalizados) estão disponíveis em gráficos (Figuras 20 a 26). Nas estirpes SG Fla+, SE e ST observou-se expressão do gene *fliC* na presença de lisofosfolídeos. Em SP, SG e SE  $\Delta fliJ$  houve repressão do *fliC* na presença do estímulo. Não houve expressão do *fliC* em SE  $\Delta fliC$ .

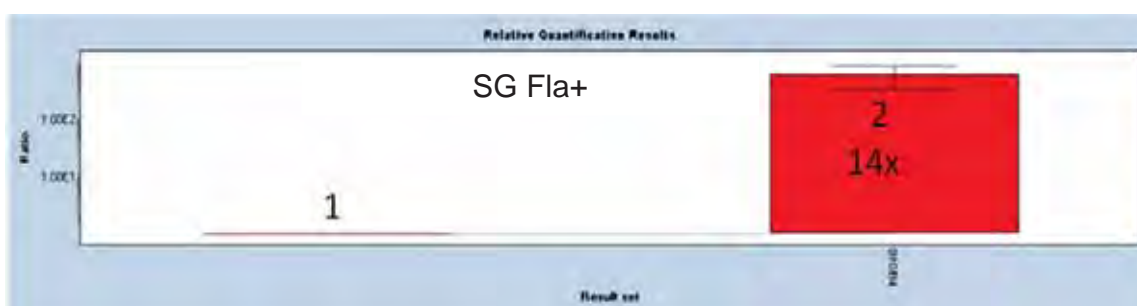


Figura 20. Expressão do gene *fliC* em SG Fla+ incubada sem (1) e com lisofosfolídeos (2).

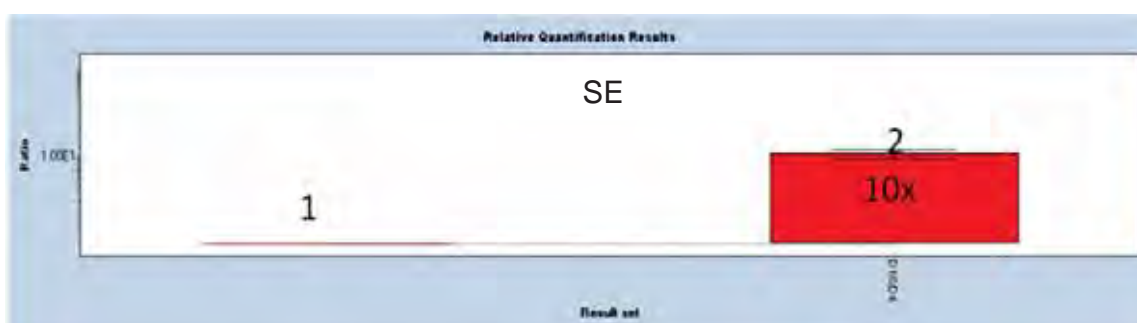


Figura 21. Expressão do gene *fliC* em SE incubada sem (1) e com lisofosfolídeos (2).

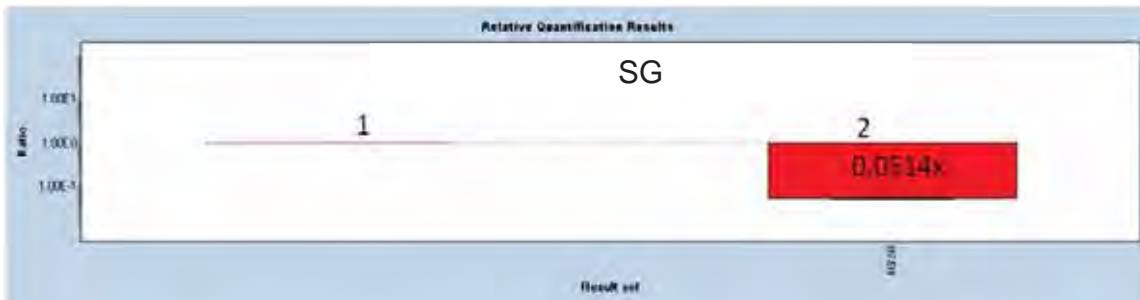


Figura 22. Expressão do gene *fliC* em SG incubada sem (1) e com lisofosfolídeos (2).

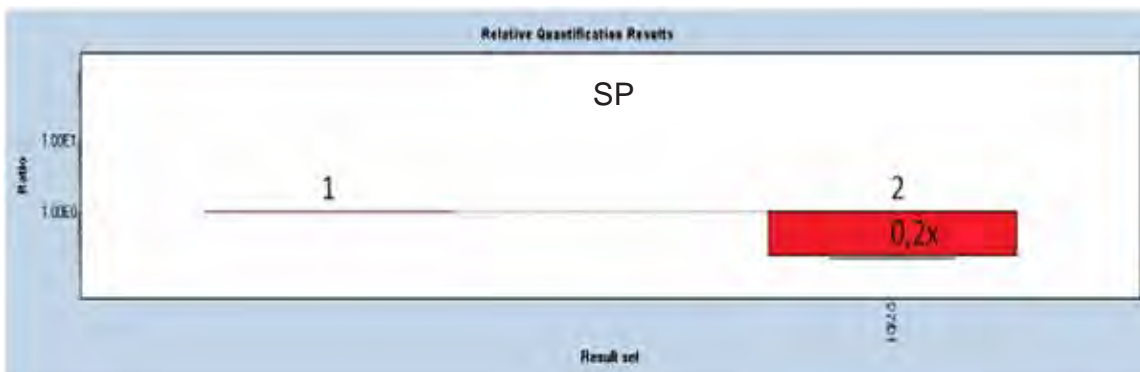


Figura 23. Expressão do gene *fliC* em SP incubada sem (1) e com lisofosfolídeos (2).

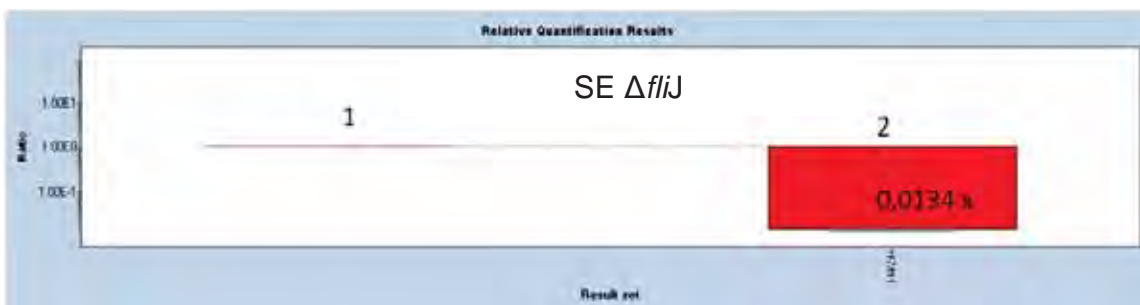


Figura 24. Expressão do gene *fliC* em SE  $\Delta fliJ$  incubada sem (1) e com lisofosfolídeos (2).

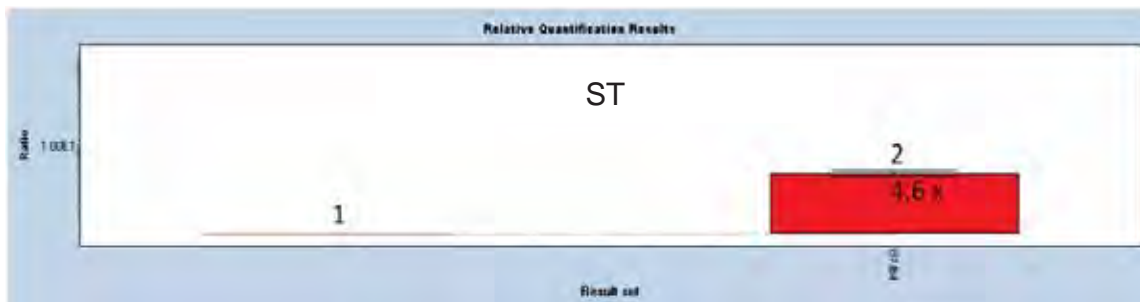


Figura 25. Expressão do gene *fliC* em ST incubada sem (1) e com (2) lisofosfolídeos.



Figura 26. Expressão do gene *fliC* em SE  $\Delta fliC$  incubada sem (1) e com (2) lisofosfolídeos.

## 5.6 Quantificação bacteriana intracelular e da expressão de gênica celular

### 5.6.1 Contagem das estirpes *Salmonella* spp. no interior células de rins de galinhas (CRGs)

A Tabela 8 contém os resultados da quantificação de *Salmonella* spp. duas, seis e 24 hpi de CRGs. A contagem de SE foi maior que a das demais estirpes ( $p < 0,05$ ) em todos os momentos. O número de SG Fla+ foi maior que o de SG e SP em todos os momentos ( $p < 0,05$ ). Às duas e seis hpi, a contagem de SG Fla+ foi estatisticamente igual a de SE  $\Delta fliJ$  e SE  $\Delta fliC$  ( $p > 0,05$ ), mas foi inferior às 24 hpi ( $p < 0,05$ ).

Tabela 8. Número de células viáveis de *Salmonella* spp. ( $\log_{10}$ ) no interior de células de rins de galinhas (CRGs) em diferentes intervalos de tempo.

Estirpe	Horas após a infecção		
	2 horas	6 horas	24 horas
SE	5,85 <b>A</b> $\pm$ 0,10	6,48 <b>A</b> $\pm$ 0,14	6,78 <b>A</b> $\pm$ 0,16
SE $\Delta$ fliJ	3,55 <b>B</b> $\pm$ 0,12	3,45 <b>B</b> $\pm$ 0,09	4,33 <b>B</b> $\pm$ 0,18
SE $\Delta$ fliC	3,96 <b>B</b> $\pm$ 0,15	4,00 <b>B</b> $\pm$ 0,26	4,70 <b>B</b> $\pm$ 0
SP	2,33 <b>D</b> $\pm$ 0,12	2,53 <b>C</b> $\pm$ 0,19	2,20 <b>E</b> $\pm$ 0,12
SG	3,18 <b>C</b> $\pm$ 0,31	2,78 <b>C</b> $\pm$ 0,23	3,05 <b>D</b> $\pm$ 0,13
SG Fla <sup>+</sup>	3,83 <b>B</b> $\pm$ 0,17	3,88 <b>B</b> $\pm$ 0,10	3,75 <b>C</b> $\pm$ 0,13

Médias e desvio padrão da contagem bacteriana intracelular de quatro ensaios. SE= *Salmonella* Enteritidis; SG= *S. Gallinarum*; SP= *S. Pullorum*;  $\Delta$ fliJ e  $\Delta$ fliC= genes inativados; SG Fla+= Mutante de SG capaz de produzir flagelos. \*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

### 5.6.2 Contagem das estirpes de *Salmonella* spp. no interior de macrófagos de aves (HD11)

A Tabela 9 contém os resultados da quantificação de *Salmonella* spp. duas, seis e 24 hpi de HD11. A contagem de SE foi maior que a de SG, SG Fla<sup>+</sup> e SP ( $p < 0,05$ ) em todos os momentos. Às duas e seis hpi, o número de SE foi superior que o de SE  $\Delta$ fliJ e SE  $\Delta$ fliC ( $p < 0,05$ ), enquanto que às 24 hpi o número de SE foi semelhante ao de SE  $\Delta$ fliJ e SE  $\Delta$ fliC ( $p > 0,05$ ).

Tabela 9. Número de células viáveis de *Salmonella* spp. ( $\log_{10}$ ) em macrófagos de galinhas (linhagem HD11) em diferentes intervalos de tempo.

Estirpes	Horas após a infecção		
	2 horas	6 horas	24 horas
<b>SE</b>	5,80 <b>A</b> $\pm$ 0,22	6,40 <b>A</b> $\pm$ 0,19	4,30 <b>A</b> $\pm$ 0,34
<b>SE <math>\Delta</math>ffiJ</b>	4,93 <b>B</b> $\pm$ 0,39	5,25 <b>B</b> $\pm$ 0,29	3,85 <b>A</b> $\pm$ 0,60
<b>SE <math>\Delta</math>ffiC</b>	5,15 <b>B</b> $\pm$ 0,54	5,70 <b>B</b> $\pm$ 0,49	4,27 <b>A</b> $\pm$ 0,89
<b>SP</b>	3,75 <b>C</b> $\pm$ 0,31	4,23 <b>C</b> $\pm$ 0,34	2,40 <b>C</b> $\pm$ 0,40
<b>SG</b>	4,63 <b>B</b> $\pm$ 0,22	4,60 <b>BC</b> $\pm$ 0,28	2,90 <b>BC</b> $\pm$ 0,56
<b>SG Fla<sup>+</sup></b>	4,35 <b>BC</b> $\pm$ 0,25	4,33 <b>C</b> $\pm$ 0,36	3,18 <b>B</b> $\pm$ 0,47

Médias e desvio padrão da contagem bacteriana intracelular de quatro ensaios. SE= *Salmonella* Enteritidis; SG= *S. Gallinarum*; SP= *S. Pullorum*;  $\Delta$ ffiJ e  $\Delta$ ffiC= genes inativados; SG Fla+= Mutante de SG capaz de produzir flagelos. \*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.6.3 Expressão de iNOS, CXCLi1, CXCLi2, IL-6 e TLR-5 em células epiteliais de rins de galinhas (CRGs)

A expressão dos genes responsáveis por iNOS, CXCLi1, CXCLi2, IL-6 e TLR-5 foi quantificada seis hpi de CRGs com estirpes de *Salmonella* spp. (SE, SG, SP, SG Fla+, SE  $\Delta$ fliJ, SE  $\Delta$ fliC). Os dados da expressão gênica foram agrupados em gráficos (Figuras 27 e 28).

SE induziu à expressão de CXCLi1 em CRGs mais elevada que as demais estirpes ( $p < 0,05$ ). A expressão de CXCLi2 provocada por SE foi maior que a induzida pelas outras estirpes ( $p < 0,05$ ). A infecção de CRGs por SG Fla+ provocou maior expressão de CXCLi2 que SG, SP, SE  $\Delta$ fliJ e SE  $\Delta$ fliC ( $p < 0,05$ ). A expressão de iNOS foi mais elevada em CRGs infectados com SE ( $p < 0,05$ ), mas SG Fla+ induziu maior expressão de iNOS que SG, SP, SE  $\Delta$ fliJ e SE  $\Delta$ fliC ( $p < 0,05$ ). A expressão de IL-6 foi mais elevada em células infectadas por SG Fla+ e SE que naquelas infectadas pelas demais estirpes ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre as médias da expressão de TLR-5 ( $p > 0,05$ ).

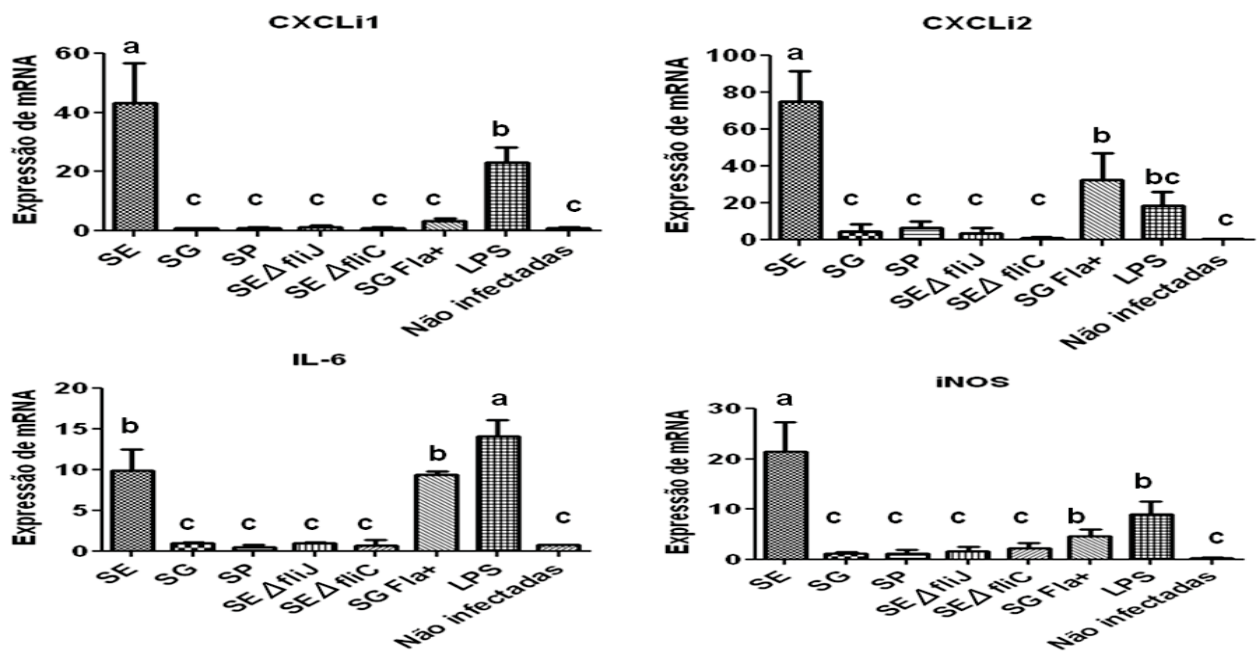


Figura 27. Média dos valores normalizados da expressão relativa de CXCLi1, CXCLi2, IL-6 e iNOS em CRGs 6 hpi com *Salmonella* spp. A expressão gênica nas células não infectadas foi considerada como controle negativo. Os valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% ( $p < 0,05$ ).



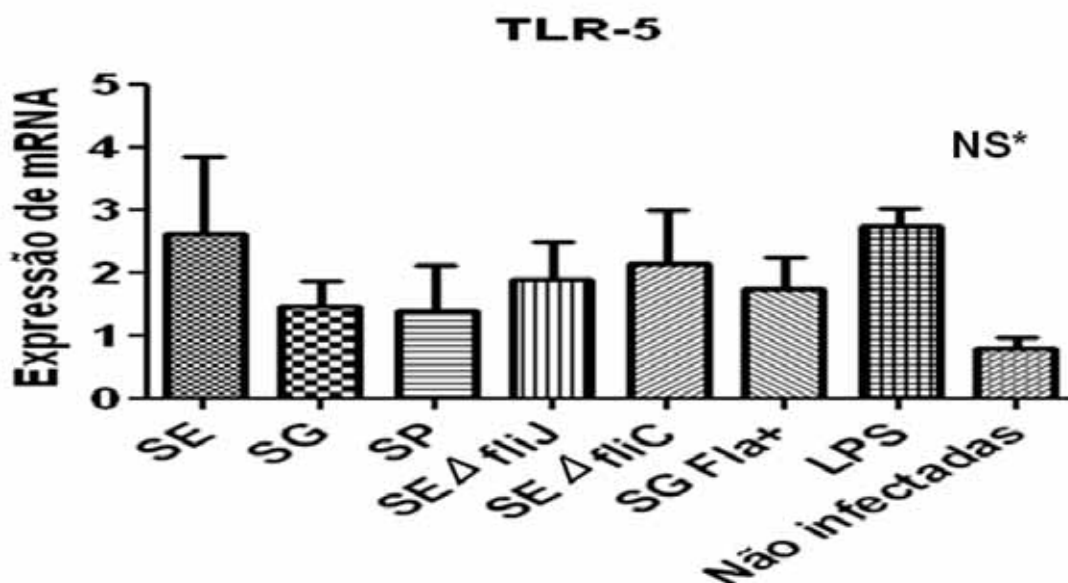


Figura 28. Média dos valores normalizados da expressão relativa de TLR-5 em CRGs seis hpi com *Salmonella* spp. A expressão gênica nas células não infectadas foi considerada como controle negativo. Não houve diferença significativa (NS\*) entre as médias ( $p > 0,05$ ).

#### 5.6.4 Expressão dos genes responsáveis por mediadores da resposta imune em macrófagos de galinhas (linhagem HD11)

A expressão de iNOS, CXCLi1 (K60), CXCLi2 (IL-8), IL-6, INF- $\gamma$ , IL-4, IL-13 e IL-10, LITAF, IL-12 $\beta$ , IL-18, MIP-1 $\beta$  (CCLi2), TLR-4 e TLR-5 foram mensurados em macrófagos de galinhas seis hpi com estirpes de *Salmonella* spp. Os dados da expressão gênica (valores normalizados) foram agrupados em gráficos de barras (Figuras 29, 30, 31 e 32).

Não houve expressão de IL-13. As médias da expressão de CXCLi1, iNOS, IL-12 $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-18, LITAF, IL-4, IL-10, TLR-4 e TLR-5 induzidas pelas diferentes estirpes não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). A expressão de CXCLi2 em células infectadas por SE foi maior que a provocada por SG e SE  $\Delta$ fliC ( $p < 0,05$ ). A infecção de macrófagos por SE  $\Delta$ fliJ induziu a uma maior expressão de IL-6 que a infecção por SG ( $p < 0,05$ ). SE induziu a maior expressão de MIP-1 $\beta$  que SG ( $p < 0,05$ ).

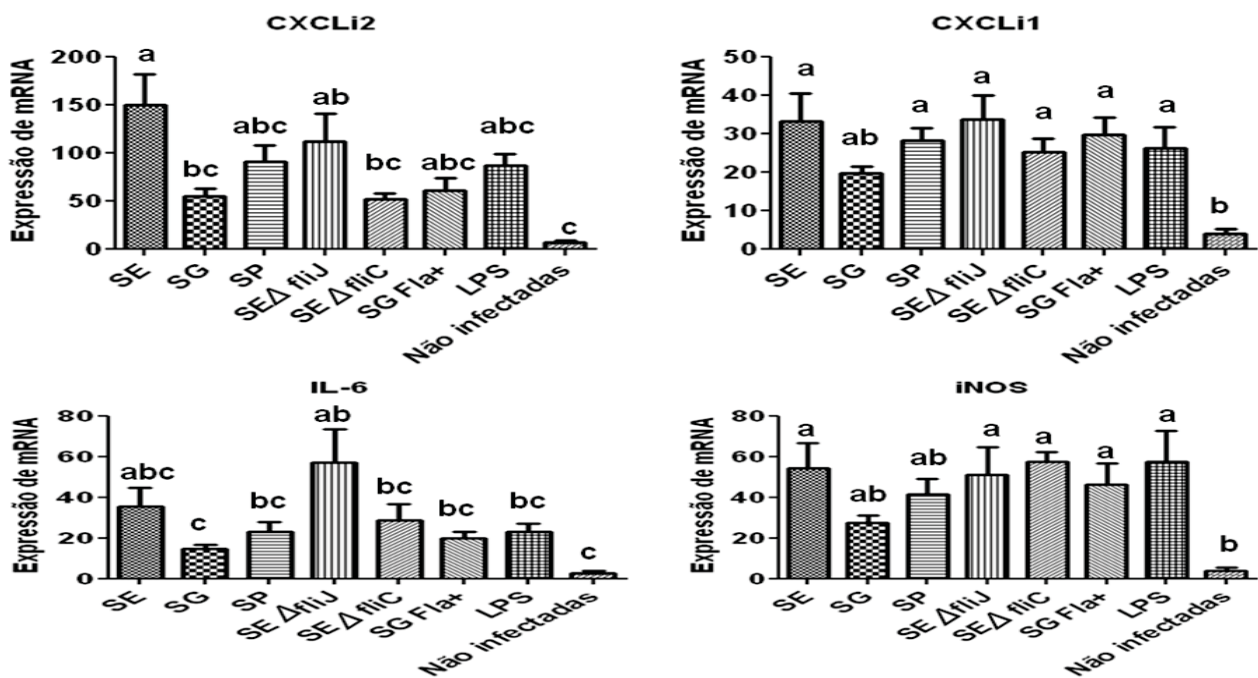


Figura 29. Média dos valores da normalizados da expressão relativa de CXCLi, CXLi-2, IL-6 e iNOS em HD11 seis hpi com *Salmonella* spp. A expressão gênica nas células não infectadas foi considerada como controle negativo. Os valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

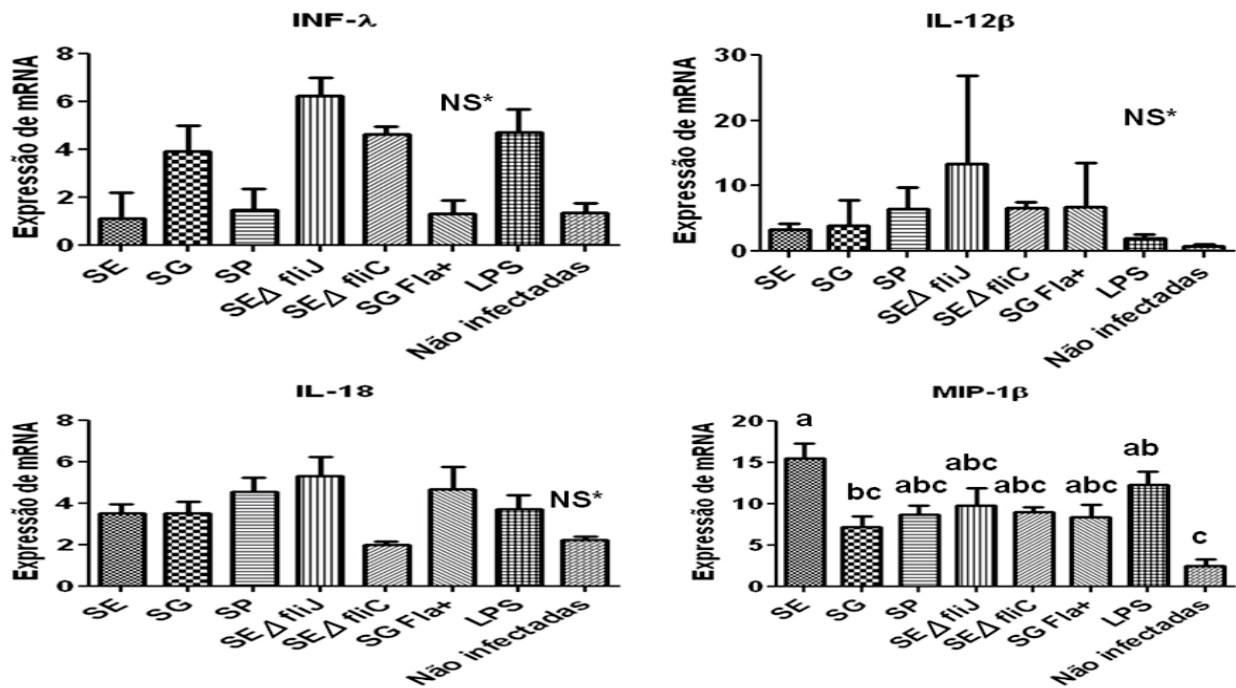


Figura 30. Média dos valores normalizados da expressão relativa de INF- $\gamma$ , IL-12 $\beta$ , IL-18 e MIP-1 $\beta$  em HD 11 seis hpi com *Salmonella* spp. A expressão gênica nas células não infectadas foi considerada como controle negativo. Os valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. NS\* = não houve diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

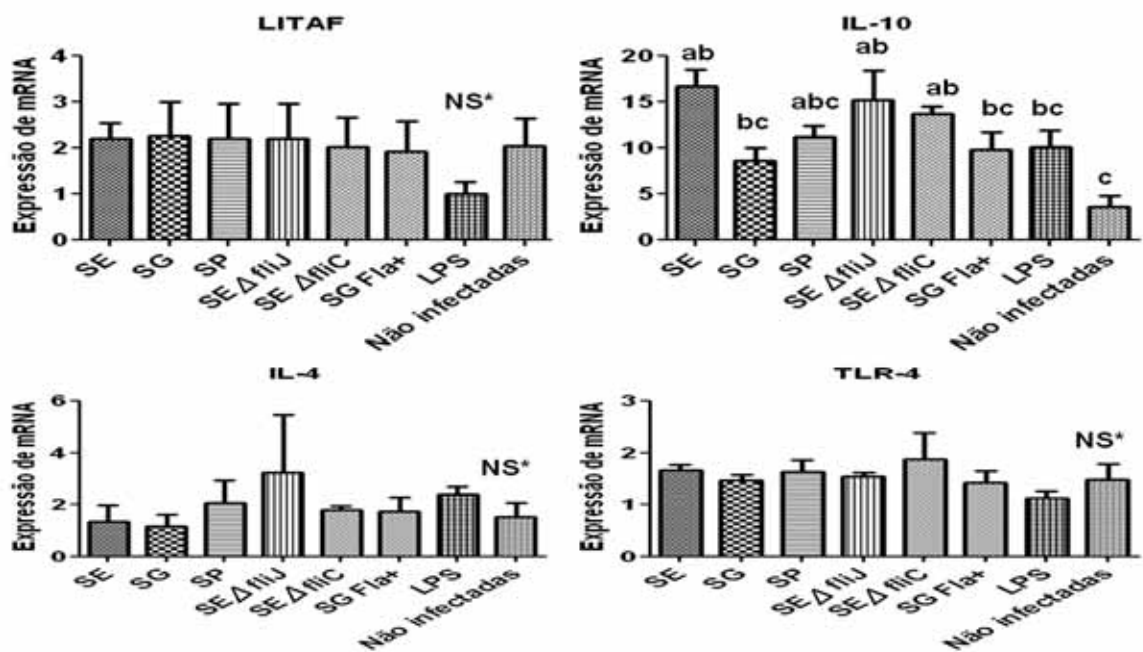


Figura 31. Média dos valores normalizados da expressão relativa de LITAF, IL-4, IL-10 e TLR-4 em HD 11 seis hpi com *Salmonella* spp. A expressão gênica nas células não infectadas foi considerada como controle negativo. Os valores seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. NS\* = não houve diferença significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

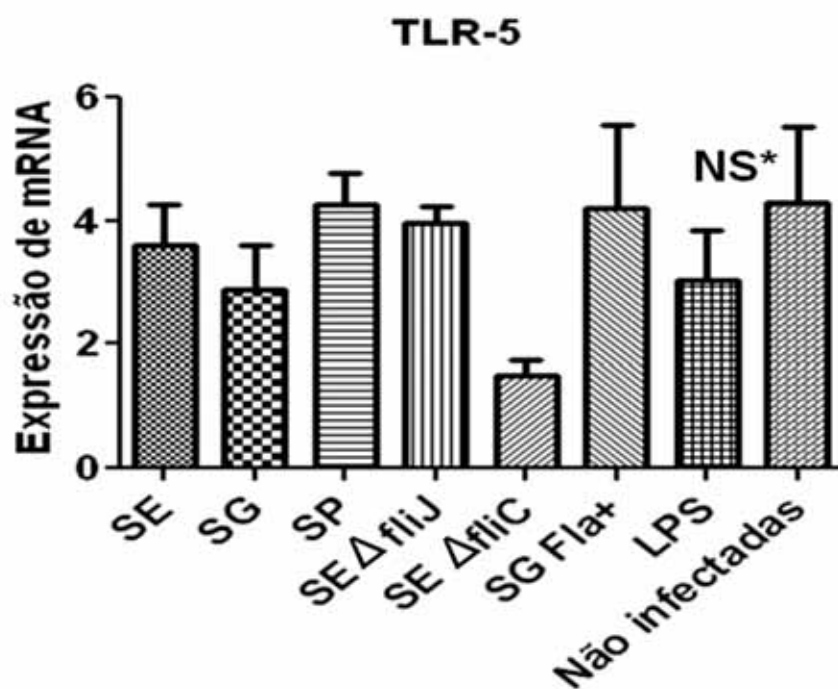


Figura 32. Média dos valores normalizados da expressão relativa de TLR-5 em HD 11 seis hpi com *Salmonella* spp. Não houve diferença significativa (NS\*) entre as médias ( $p > 0,05$ ).

## 5.7 Ensaio *in vivo*. Avaliação da patogenicia

No ensaio *in vivo*, notou-se que aves de todos os grupos mostraram sinais de depressão, fraqueza, penas eriçadas, asas caídas, olhos fechados e diarreia esverdeada. Dentre estas, algumas vieram a óbito dois a três dias após o início dos sinais, antes da segunda semana após o desafio. Algumas aves dos grupos B e D (desafiadas com SG Fla+) se recuperaram e outras morreram após o 14<sup>o</sup> dia após a infecção (dpi). Seis aves do grupo A e quatro do grupo C (desafiadas com a estirpe selvagem) morreram subitamente, sem apresentarem sinais clínicos, aos cinco dpi. Algumas aves dos grupos B e D não apresentaram sinais de doença. SG Fla+ provocou uma mortalidade dose dependente que foi menor que a provocada por SG ( $p < 0,05$ ). A Tabela 10 contém os resultados da mortalidade.

Aves remanescentes foram eutanasiadas, avaliando-se a presença de alterações macroscópicas em fígado, baço e parede do ceco. Notou-se hepatomegalia e esplenomegalia com a presença de pontos esbranquiçados em quatro aves do grupo B e em uma ave do grupo D (Figura 33). Duas aves do grupo B apresentaram espessamento do pericárdio sugestivo de pericardite (Figura 34). Aparentemente, os fígados e baços das outras 15 aves do grupo D estavam normais. Processo inflamatório na parede do ceco foi observado em três das seis aves do grupo B. Em uma delas, o ceco apresentava exsudato fibrinoso no lúmen (Figura 35). Os cecos de 9 aves do grupo D estavam com as tonsilas avermelhadas e com aumento de volume (Figura 36).

SG Fla+ pôde ser isolada no fígado de 5 aves do grupo B e de uma ave do grupo D. Esta estirpe também foi isolada em baço de duas aves do grupo B e ainda no conteúdo cecal de três aves deste mesmo grupo.

Tabela 10. Mortalidade de aves desafiadas com SG e SG Fla+ aos cinco dias de vida.

Estirpe	Grupo	Número De aves	Dias após infecção																			Mortalidade (%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	...		28
SG	A	30	0	0	0	0	12	22	28	29	29	30	30	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100
SG Fla+	B	30	0	0	0	0	3	11	20	22	22	22	22	23	23	23	24	24	-	-	-	24	80*
SG	C	30	0	0	0	0	9	17	26	28	28	28	29	29	30	30	-	-	-	-	-	30	100
SG Fla+	D	30	0	0	0	0	1	5	7	8	10	11	11	11	11	11	11	12	13	13	14	14	46,7*

Aves dos grupos **A** and **B** receberam 0,2 mL de cultura contendo aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ mL e aves dos grupos **C** e **D** receberam 0,2 mL da mesma cultura diluída 100 vezes. \* = Diferenças significativas entre as porcentagens de mortalidade por meio do teste exato de Fisher ( $p < 0,05$ ).

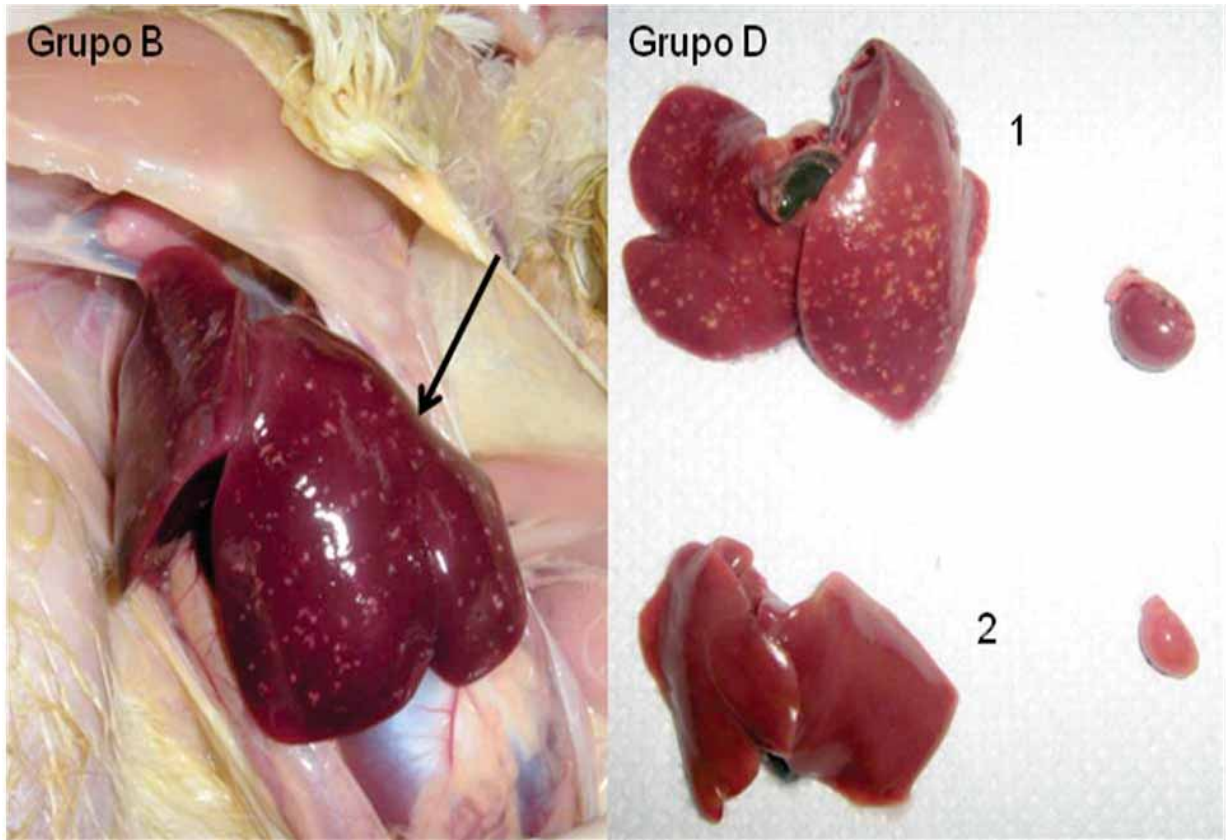


Figura 33. Lesões macroscópicas em fígado e baço de pintinhas para postura comercial de ovos vermelhos, 28 dias após a infecção com SG Fla+. Note hepatomegalia e presença de pontos esbranquiçados (seta). Notar hepato e esplenomegalia em ave do grupo D (1) e ausência de lesões macroscópicas em ave do mesmo grupo (2).



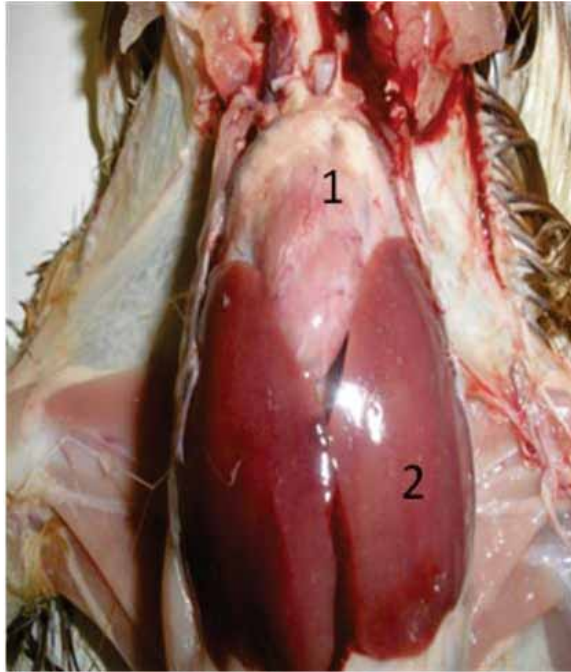


Figura 34. Lesões macroscópicas em coração e fígado de pintinhas para postura comercial de ovos vermelhos, 28 dias após a infecção com SG Fla+ (Grupo B). Notar espessamento do pericárdio (1) e hepatomegalia (2).

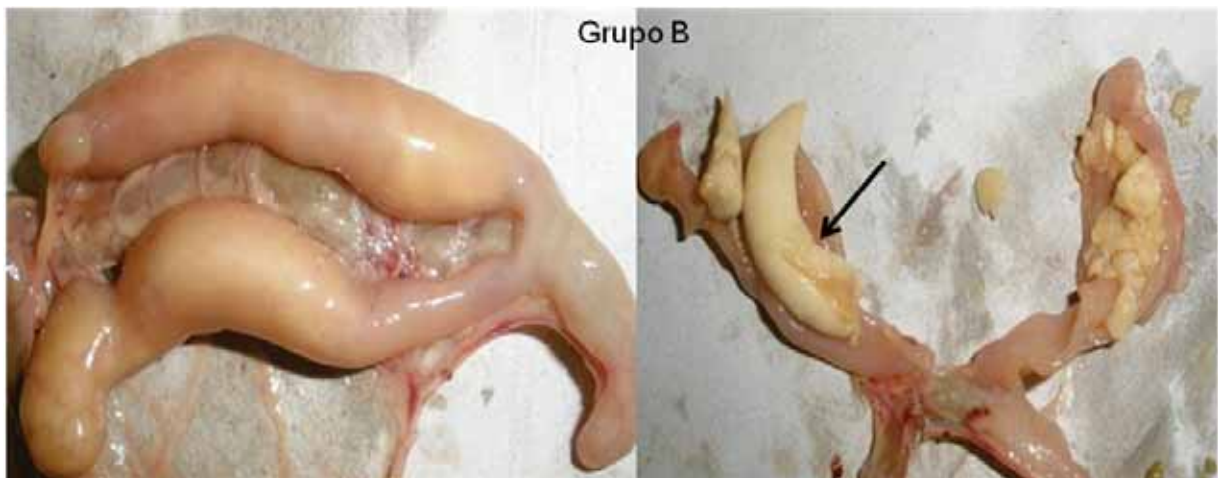


Figura 35. Aspecto macroscópico de ceco de pintinhas para postura comercial de ovos vermelhos, 28 dias após a infecção com SG Fla+. Notar a presença de exsudato fibrinoso no lúmen do ceco (seta).



Figura 36. Aspecto macroscópico de ceco de pintinhas para postura comercial de ovos vermelhos, 28 dias após a infecção com SG Fla+. Note a tonsila cecal com rubor e bem evidente, sugestivo de inflamação (seta).

## VI. DISCUSSÃO

Devido à proximidade filogenética, *S. Enteritidis* (SE), *S. Gallinarum* (SG) e *S. Pullorum* (SP) possuem genomas e fenótipos semelhantes. Entretanto, provocam enfermidades distintas nas aves. A ausência de flagelos em SG e SP tem sido considerada como uma das possíveis causas da diferença na patogenicidade destas bactérias (LI et al., 1993; KAISER et al., 2000; IQBAL et al., 2005). Pesquisas realizadas com o intuito de investigar essa hipótese, ficaram restritas à avaliação da patogenicidade de estirpes de SE e *S. Typhimurium* (ST) com a síntese de flagelos defectiva (ALLEN-VERCOE & WOODWARD, 1999; DIBB-FULLER & WOODWARD, 2000; IQBAL et al., 2005). Como a relação hospedeiro-parasita entre salmonelas paratíficas e as aves difere muito da relação observada no tifo aviário, a indução da produção de flagelos em SG seria necessária para a compreensão da patogenia das salmoneloses aviárias.

Na análise do genoma de SG foram encontrados 309 pseudogenes, dos quais cinco (*cheM*, *flhA*, *flhB*, *flgK* e *flgI*) estão relacionados com a produção de flagelo. A presença de muitos pseudogenes sugere que a severidade da infecção das aves por SG seria decorrente da ausência de proteínas ou mesmo de estruturas, como por exemplo, o flagelo (THOMSON et al., 2008). No presente estudo, a substituição dos pseudogenes *cheM*, *flhA*, *flhB*, *flgK* e *flgI* em SG, por genes íntegros, oriundos de SE, permitiu a recuperação da produção de flagelos e de motilidade em SG Fla+ (figuras 15, 18 e 19) e com isso sua utilização em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Segundo SUBRAMANIAN & QADRI (2006), em trabalho realizado com ST, os monômeros de flagelina capazes de ativar os TLR-5 não são originários do flagelo, sendo sintetizados por outra via, quando a bactéria entra em contato com moléculas de lisofosfolípídeos presentes nas células intestinais do hospedeiro. No presente estudo,

contudo, após o estímulo com lisofosfolípídeos, observou-se um aumento da expressão do gene *fliC* nas estirpes que possuem flagelos (figuras 20 a 25). Em SP, SG e SE  $\Delta fliJ$ , que não possuem flagelo, mas possuem o gene *fliC* íntegro, houve repressão do mesmo. Esses resultados sugerem que, pelo menos em SE, SG e SP, a flagelina induzida por lisofosfolípídeos seria originária do flagelo, mas para conclusões precisas, mais estudos seriam necessários.

Para verificar se o flagelo influenciaria na patogenicidade das estirpes de *Salmonella* spp., avaliou-se a capacidade de invasão e sobrevivência das mesmas em células de rins de pintaínhos (CRGs) e em macrófagos de aves, da linhagem HD11. A quantidade de SE no interior de CRGs foi superior à de SG, SP, SG Fla+, SE  $\Delta fliJ$  e SE  $\Delta fliC$  ( $p < 0,05$ ) em todos os momentos. A quantidade de SG Fla+ no interior de CRGs foi superior à de SG e SP durante todo o experimento ( $p < 0,05$ ). Assim sendo, pode-se considerar que o flagelo foi importante para a invasão de células epiteliais. Resultados semelhantes foram descritos por VAN ASTEN et al. (2000) e SHAH et al. (2011) que demonstraram redução na capacidade de invasão de estirpes mutantes de SE sem flagelos em células Caco-2. BARROW & LOVELL (1989), observaram que SG e SP são naturalmente menos invasivos que SE e ST para células VERO e de acordo com WIGLEY et al. (2006), a ausência de flagelos seria a principal. Embora o flagelo tenha aumentado a capacidade de invasão de SG Fla+ em comparação com SG e SP, a quantidade desse microorganismo no interior de CRGs se manteve inferior à de SE. De acordo com KHORAMIAN-FALSAFI et al. (1990), não apenas o flagelo, mas também a motilidade estaria relacionada com a invasão de células epiteliais por *Salmonella* spp. No presente trabalho, constatou-se que SG Fla+ se multiplicava na superfície do ágar semi-sólido de forma mais lenta que SE (Figura 15), sugerindo que essa estirpe seja menos móvel que SE, o que explicaria em partes porque SE é mais invasiva. Mesmo não possuindo flagelos, SE  $\Delta fliJ$  e SE  $\Delta fliC$  se mantiveram, no interior dos CRGs, em quantidades iguais ou mesmo superiores (às 24 hpi) à de SG Fla+, sugerindo que não apenas o flagelo e a motilidade, mas também outros fatores de virulência, provavelmente ausentes em SG Fla+, estariam envolvidos no processo de invasão de células epiteliais.

A quantidade de SE no interior de macrófagos HD11 foi superior à de SG, SP, SG Fla+ em todos os momentos analisados e superior à de SE  $\Delta fliJ$  e SE  $\Delta fliC$  às duas e seis horas após a infecção (hpi) ( $p < 0,05$ ). Resultado semelhante foi encontrado por SHAH et al. (2011), os quais observaram menores quantidades intracelulares de estirpes de SE imóveis em comparação com a estirpe selvagem, duas hpi de macrófagos HD11. Segundo METCALFE et al. (2010), o flagelo ativaria os TLR-5, aumentando a atividade fagocítica e também a taxa de destruição bacteriana intracelular dos macrófagos. Isso explicaria a redução mais acentuada na quantidade de SE que na de SE  $\Delta fliJ$  e SE  $\Delta fliC$ , no interior dos macrófagos HD11 às 24 hpi. Embora SG Fla+ seja móvel e flagelada, a quantidade desta estirpe no interior das células HD11 não diferiu de SG, contrariando os achados apresentados por SHAH et al. (2011) a respeito de SE. É provável que outros fatores estejam envolvidos no processo de infecção celular, tendo-se em vista a diversidade de patogenicidade entre SG e SE para aves (BERCHIERI & FREITAS NETO, 2009).

Embora o papel das citocinas e quimiocinas na resposta imune e patogenia da infecção por *Salmonella* spp. seja bem caracterizado em mamíferos, permanece pouco compreendido em aves. Para se conhecer algumas das respostas imunes celulares que seriam induzidas pelo flagelo durante a infecção de aves, realizou-se a mensuração da expressão de genes responsáveis por mediadores da resposta imune em CRGs e HD11, seis hpi. Em ensaios *in vivo* bem como *in vitro*, ST e SE, ao contrário de SG e SP, induziram à expressão de níveis elevados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em células epiteliais de aves (KAISER et al., 2000; WITANAGE et al., 2004; IQBAL et al., 2005; CHAPPELL et al., 2009). A ausência de flagelos em SP e SG seria a principal explicação para a baixa resposta pró-inflamatória induzida por estes biovares (KAISER et al., 2000; WIGLEY & KAISER, 2003; CHAPPELL et al., 2009). Essa hipótese foi reforçada por IQBAL et al. (2005), os quais observaram níveis de expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6, na parede do ceco de aves infectadas por um mutante de ST aflagelado, inferiores aos induzidos pela estirpe selvagem. No presente estudo, as estirpes flageladas SE e SG Fla+ induziram à expressão de genes responsáveis por CXCLi2, IL-6 e iNOS nas CRGs em níveis superiores aos induzidos pelas estirpes sem

flagelos ( $p < 0,05$ ), sugerindo que essa organela seria importante para o desencadeamento da resposta imune pró-inflamatória durante as salmoneloses aviárias.

Apesar dos flagelos serem reconhecidos como estimuladores da produção de CXCLi1 durante a infecção de aves por ST e SE (WITANAGE et al., 2004; CHAPPELL et al., 2009), o mesmo não foi observado com SG Fla+, sugerindo que outro antígeno bacteriano estimularia a produção. Embora não seja possível afirmar, os resultados deixaram entrever que o LPS seria o indutor de CXCLi1. Ressalta-se que o LPS é um reconhecido PAMP com capacidade de estimular respostas imunes no hospedeiro (KOGUT et al., 2005).

Segundo IQBAL et al. (2005), a interação entre flagelina de *Salmonella* spp. e os TLR-5, presentes nos enterócitos, seria uma etapa necessária para indução de resposta pró-inflamatória no intestino da ave. Entretanto, nesse estudo, apesar de SE e SG Fla + terem estimulado a expressão de CXCLi2 e IL-6 em CRGs em níveis elevados, não induziram a expressão de TLR-5. MACKINNON et al. (2009) também obtiveram resultado similar ao mensurar a expressão de TLR-5 no intestino de pintaínhos após a infecção com SE e sugeriram que a ausência de expressão dos TLR-5 seria decorrente de um mecanismo de *feedback* negativo para evitar a superestimulação das células. Durante a infecção do hospedeiro a flagelina seria, de alguma forma, transportada até a região basolateral dos enterócitos para então estimular os TLR-5 (GEWIRTZ et al., 2001). Vale mencionar que nos CRGs a interação entre flagelina e TLR-5 não ocorreria da mesma forma.

Macrófagos são células fagocíticas que atuam tanto na resposta imune inata como adaptativa. Além da função de reconhecimento e fagocitose de patógenos, estas células secretam citocinas e quimiocinas que auxiliam na modulação da resposta imune adquirida, que pode ser do tipo Th1 ou Th2 (HE et al., 2011). Os componentes estruturais de *Salmonella* spp. juntamente com seus mecanismos de patogenicidade influenciam no tipo de resposta imune produzida pelo o organismo da ave e, por isso, definem a patogenia das salmoneloses aviárias (BERCHIERI & FREITAS NETO, 2009). Na tentativa de se conhecer a imunidade e a função de estruturas bacterianas durante

a infecção aves por *Salmonella* spp., alguns estudos *in vitro* foram realizados com macrófagos (IQBAL et al., 2005; WIGLEY et al., 2006; ZHANG et al., 2008; CIRACI et al., 2010). No entanto, não avaliaram as respostas imunes induzidas por mutantes de *Salmonella* spp. com alterações em genes relacionados à síntese de flagelo. Neste contexto, o presente estudo é pioneiro, pois compara a resposta imune de macrófagos HD11 infectados com estirpes flageladas e aflageladas de um mesmo microrganismo.

Os resultados demonstraram que as estirpes de *Salmonella* spp. estimularam, em níveis variados, a expressão de mediadores da resposta imune pró-inflamatória em macrófagos HD11, incluindo CXCLi1, CXCLi2, MIP-1 $\beta$ , IL-6 e iNOS. Houve diferença nos níveis de expressão de CXCLi2, IL-6 e MIP-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ). Entretanto, ao contrário do que foi observado na infecção de CRGs, não esteve relacionada com a presença de flagelos. Mesmo estirpes sem flagelos, como por exemplo, SP, estimularam a expressão de CXCLi2, IL-6 e MIP-1 $\beta$  em quantidades semelhantes às induzidas por SE. Não houve diferenças nos níveis de expressão de TLR-4, TLR-5, IL-10, por LITAF e de citocinas ligadas às respostas do tipo Th1 (IL-18, INF- $\gamma$ , IL-12 $\beta$ ) e Th2 (IL-4) induzidos pelas estirpes. Provavelmente, outras moléculas ou estruturas, e não o flagelo, estariam envolvidas na estimulação de respostas imunes pró-inflamatória e adaptativa em macrófagos HD11 (IQBAL et al., 2005; WIGLEY et al., 2006; ZHANG et al., 2008).

Conforme consta na Tabela 10, SG Fla+ provocou mortalidade inferior à causada pela estirpe selvagem. Analisando estes dados em conjunto com os de PARKER & GUARD-PETTER (2001), os quais infectaram aves SPF (*specific pathogen free*) com SE (móvel), cuja mortalidade foi nula, e com um mutante imóvel que provocou 100% de mortalidade, pode-se considerar que a presença do flagelo alterou a patogenicidade da bactéria. De forma semelhante, a mesma situação foi observada por IQBAL et al. (2005) com ST em aves SPF. Esses autores ainda demonstraram, por meio de exame histológico, que a inflamação foi mais acentuada no epitélio intestinal de aves desafiadas por ST. No presente estudo, não foram realizados exames histológicos, mas o exame macroscópico revelou alterações anatomopatológicas na parede do ceco sugestivas de processo inflamatório (Figura 35).

No presente trabalho, aves dos quatro grupos apresentaram sinais clínicos típicos de tifo aviário (SHIVAPRASSAD, 2000; FREITAS NETO et al., 2007; BARROW & FREITAS NETO, 2011). Os sinais foram mais discretos naquelas desafiadas com SG Fla+. Durante a necrópsia das aves sobreviventes, observou-se alterações macroscópicas mais evidentes naquelas que receberam o inóculo não diluído. Apesar do flagelo ter reduzido a patogenicidade de SG Fla+, não conferiu atenuação completa. Portanto, outros mecanismos de patogenicidade, presentes neste biovar, também estariam envolvidos na patogenia do tifo aviário (HENSEL, 2000; JONES et al., 2001; BERCHIERI & FREITAS NETO, 2009; CHAPPELL et al., 2009).

SG e SP não colonizam o trato entérico da mesma forma que SE (BARROW & FREITAS NETO, 2011). Em infecções de aves por SE ocorre elevada e persistente colonização dos cecos (SHIVAPRASSAD 1990; GAST & HOLT, 1998). Parece que o flagelo, e não a fímbria, seria a principal organela envolvida na colonização intestinal (ALLEN et al., 1999; ALLEN & VERCOE et al., 1999). Em infecções por SG observa-se pouca ou nenhuma colonização intestinal. Encontra-se SG no conteúdo cecal nos primeiros dias após a infecção ou quando a ave está próximo ao óbito (OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, no presente estudo, SG Fla foi isolada do conteúdo cecal de algumas aves, aparentemente saudáveis, aos 28 dias após a infecção, indicando que a esta estirpe colonizou o intestino das aves, o que não é observado com estirpes de SG. SG Fla+ foi isolada de fígado e de baço quatro semanas após o desafio, indicando um grau de persistência dessa estirpe em aves susceptíveis ao tifo aviário, o que não é comum (OLIVEIRA et al., 2005; WIGLEY et al., 2005; FREITAS NETO et al., 2007).

Os resultados da infecção dos CRGs, juntamente com as alterações anatomopatológicas observadas nos cecos das aves, indicam que SG Fla+ é capaz de induzir à resposta pró-inflamatória de maior intensidade que SG. A presença de flagelos em SG Fla+ promoveu resposta imune capaz de reduzir a infecção sistêmica e, com isso, diminuir a mortalidade das aves.



## VII. CONCLUSÕES

Na condições em que se realizou o presente estudo, concluiu-se que:

O flagelo, quando introduzido no biovar SG, reduz sua patogenicidade para aves.

Com a utilização de métodos moleculares, produz-se uma estirpe de SG móvel por produzir flagelos (SG Fla+).

A elevação na expressão do gene *fliC*, após estimulação com lisofosfolipídeos é observada apenas em estirpes que possuem flagelos.

O flagelo aumenta a capacidade de invasão das estirpes de *Salmonella* spp. para as CRGs e altera a sobrevivência de SE no interior de macrófagos da linhagem HD11, no entanto outros fatores de virulência estão envolvidos na invasão e sobrevivência.

O flagelo, quando presente em *Salmonella* spp., estimula a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em CRGs, mas não altera a expressão de mediadores da resposta imune em macrófagos da linhagem HD11.

SG Fla+ é menos patogênica que SG, sendo também capaz de colonizar o ceco de aves e causar alterações anatomopatológicas neste órgão, sugestivas de processo inflamatório.

## VIII. REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v.4, n.7, p.499-511, 2004.

ALDRIDGE, P.; HUGHES, K. T. Regulation of flagellar assembly. **Current opinion in microbiology**, Londres, v.5, n.2, p.160-165, 2002.

ALDRIDGE, P. D.; WU, C.; GNERER, J.; KARLINSEY, J. E.; HUGHES, K.; SACHS, M. S. Regulatory protein that inhibits both synthesis and use target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n.30, p. 11340-11345, 2006.

ALLEN-VERCOE, E.; SAYERS, A. R.; WOODWARD, M. J. Virulence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 122, n.3, p.395-402, 1999.

ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M. J. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgo, v.48, n.8, p.771-780, 1999.

ASSOKU, R.; BUXTON, A.; PENHALE, W. Haematological changes in acute experimental *Salmonella Gallinarum* infection in chickens. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.80, n.3, p.473-485, 1970.

AVERY, S.; ROTHWELL, L.; DEGEN, W. D.; SCHIJNS, V. E.; YOUNG, J.; KAUFMAN, J.; KAISER, P. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34. **Journal of interferon & cytokine research**, Larchmont, v.24, n.10, 600-6010, 2004.

BABU, U.; DALLOUL, R. A.; OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. S.; XIE, H.; RAYBOURNE, R. B.; GAINES, D.; HECKERT, R. A. *Salmonella* enteritidis clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v.101, n.3-4, p.251-257, 2004.

BAMBOU, J.C.; GIRAUD, A.; MENARD, S.; BEGUE.; B.; RAKOTOBE, S.; HEYMAN, M.; TADDEI, F.; CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. In vivo and ex vivo activation of the TLR-5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escheichia coli* strain. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.279, n.41, p.42984-42992, 2004.

BARDY, S. L.; NG, S. Y.; JARRELL, K. Recent advances in the structure and assembly of the archaeal flagellum. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, Nova lorque, v.7, n.1-2, p. 41-51, 2004.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. Invasion of Vero cells by *Salmonella* species. **Journal of medical Microbiology**, Reading, v. 28, p.59-67, 1989.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; BERCHIERI, A. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella* enteritidis phage type 4. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, Londres, v.20, n.4, p.681-692, 1991.

BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A. Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and immunity**, Washington, v.62, n.10, p.4602-4610, 1994.

BARROW, P. A. Salmonella infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, Londres, v.36, n.1, p.1-13, 2007.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid -- new thoughts on old diseases: a review. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, Londres, v.40, n.1, p.1-13, 2011.

BEAL, R. K.; POWERS, C.; WIGLEY, P.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with Salmonella enteric serovar Typhimurium. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, London, v.33, n.1, p.25-33, 2004.

BEAL, R. K.; POWERS, C.; DAVISON, T. F.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Clearance of enteric Salmonella enterica serovar Typhimurium in chickens is independent of B-cell function. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.2, p.1442-1444, 2006.

BERCHIERI, A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C. K.; BARROW, P. A. Further studies on vertical transmission and persistence of Salmonella enterica serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, Londres, v.30, n.4, p.297-310, 2001.

BERCHIERI, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: Berchieri, A.; Silva, E. N.; Di Fábio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F (Ed.). **Doenças das aves** 2<sup>nd</sup> ed. Campinas: FACTA, seção. 4, p.435-454, 2009.

BERG, H. C. The rotary motor of bacterial flagella. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v.72, p.19-54, 2003.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and immunity**, Washington, v.75, n.12, p.5993-6007, 2007.

BRENNAN, M. A.; COOKSON, B. T. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. **Molecular microbiology**, Oxford, v.38, n. 1, p. 31-40, 2000.

CARVER, T. J.; RUTHERFORD, K. M.; BERRIMAN<sup>1</sup>, M.; RAJANDREAM<sup>1</sup>, M.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. ACT: The Artemis Comparison Tool. Oxford University Press, June, 2005.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. *Salmonella*: annual summary 2005. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services; 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2005/SalmonellaAnnualSummary2005.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2011.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/>>. Acesso em: 14 de jan. 2011.

CHADFIELD, M. S.; BROWN, D. J.; AABO, S.; CHRISTENSEN, J. P. ; OLSEN, J.E. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.92, n.1-2, p.49-64, 2003.

CHAUBAL, L.H.; HOLT, P. S. Characterization of swimming motility and identification of flagellar proteins of *Salmonella pullorum* isolates. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.60, n.10, p.1322-1327,1999.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P. A.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.128, n.1-3, p.53-59, 2009.

CHEMINAY, C.; MOHLENBRINK, A.; HENSEL, M. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, Bethesda, v.174, n.49, p.2892-2899, 2005.

CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature reviews Microbiology**, Londres, v.6, n.6, p.455-465, 2008.

CHILCOTT, G. S.; HUGHES, K. T. The coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v. 64, n.4, p. 694-708, 2000.

CIRACI, C.; TUGGLE, C. K.; WANNEMUEHLER, M. J.; NETTLETON, D.; LAMONT, S. J. Unique genome-wide transcriptome profiles of chicken macrophages exposed to *Salmonella*-derived endotoxin. **BMC genomics**, Londres, 11:545, 2010.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acid research**, Oxford, v.16. n.12, p.10881-10890, 1988.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, n.12, p.6640-6645, 2000.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; MAST, J.; GODDEERIS, B. M.; KASPERS, B.; HAESEBROUCK, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella enteritidis* phage type four infection in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.63, n.4, p.355-367, 1998.

DIBB-FULLER, M. P.; WOODWARD, M. J. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella enteritidis* to colonization and invasion of chicks. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, Londres, v.29, n.4, p.295-304, 2000.

ESWARAPPA, S.M.; JANICE, J.; BALASUNDARAM, S. V.; DIXIT, N. M.; CHAKRAVORTTY, D. Host-specificity of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: insights from comparative genomics. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetic**, Amsterdam, v.9, n.4, p.468-473, 2009.

FARNELL, M. B.; EL HALAWANI, M.; YOU, S.; MCELROY, A. P.; HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J. In vivo biologic effects of recombinant-turkey interferon-gamma in neonatal leghorn chicks: protection against *Salmonella enteritidis* organ invasion. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.45, n.2, p.473-478, 2001.

FRANCHI, L.; AMER, A.; BODY-MALAPEL, M.; KANNEGANTI, T. D.; OZOREN, N.; JAGIRDAR, R. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. **Nature Immunology**, Londres, v.7, n.6, p.576-582, 2006.

FRASER, G. M.; HIRANO, T.; FERRIS, H. U.; DEVGAN, L.; KIHARA, M.; MACNAB, R. M. Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 48, n.4, p.1043-1057, 2003.

FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI, A. Infection of commercial laying hens with *Salmonella* Gallinarum: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.9, n.2, p.133-141, 2007.

GALKIN, V. E.; YU, X.; BIELNICKI, J.; HEUSER, J.; EWING, C. P.; GUERRY, P.; EGELMAN, E. H. Divergence of Quaternary Structures Among Bacterial Flagellar Filaments. **Science**, Washington, v.320, n. 5874, p.382-385, 2008.

GAST, R. K.; HOLT, P, S. Persistence of *Salmonella* enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. **Poultry Science**, Champaign Il, v.77, n.12, p.1759-1762.

GEWIRTZ, A. T.; RAO, A. S.; SIMON, P. O. JR.; MERLIN, D.; CARNES, D.; MADARA, J. L.; NEISH, A. S. *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway. **The Journal of clinical investigation**, Ann Arbor, v.105, n.1, p.79-92, 2000.

GEWIRTZ, A. T.; NAVA, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADERA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR-5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md.1950)**, Bethesda, v.167, n.4, p.1882-1885, 2001.



GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; CARNEIRO, L. A.; ANTIGNAC, A.; JEHANNO, M.; VIALA, J. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. **Science**, Washington, v.300, n.5625, p.1584-1587, 2003.

GILLEN, K. L.; HUGHES, K. T. Transcription from two promoters and autoregulation contribute to the control of expression of the *Salmonella typhimurium* flagellar regulatory gene *flgM*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 175, n.21, v. p.7006-7015, 1993.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **W.H.O. Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella 9th edn**. Paris: Institut Pasteur, 166p. 2007.

HARSHEY, R. M; MATSUYAMA, T. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, n.18, p.8631-8635, 1994.

HARSHEY, R. M. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. **Molecular microbiology**, Oxford, v.13, n.3, p.389-394, 1994.

HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.57, p.249-273, 2003.

HE, H.; GENOVESE, K. J.; KOGUT, M. H. Modulation of chicken macrophage effector function by T(H)1/T(H)2 cytokines. **Cytokine**, São Diego, v.53, n.3, p.363-369, 2011.

HENDERSON, S. C.; BOUNOUS, D. I.; LEE, M. D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infection and immunity**, Washington, v.67, n.7, p.3580-3586, 1999.

HENSEL, M. Salmonella pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.36, n.5, p.1015-1023, 2000.

HOLT, P. S.; CHAUBAL, L.H. Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.4, p.1016-1020, 1997.

IMRE, A.; OLASZ, F.; NAGY, B. Development of a pcr system for the characterisation of salmonella flagellin genes. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.53, n.2, p.163-172, 2005.

IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; BEAL, R. K.; GOODCHILD, M. J.; BARROW, P.; MCCONNELL, I.; MASKELL, D. J.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BOYD, Y.; SMITH, A. L. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Infection and immunity**, Washington, v.73, n.4, p.2344-50, 2005.

IKEBE, T.; IYODA, S.; KUTSUKAKE, K. Promoter analysis of the class 2 flagellar operons of *Salmonella*. **Genes & genetic systems**, Mishima, v. 74, n.4, p.179-183, 1999.

JONES, M.A.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; HULME, S. D.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and immunity**, Washington, v.69, n.9, 5471-5476, 2001.

JONES, M.A.; HULME, S. D.; BARROW, P. A.; WIGLEY, P. The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems

play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enteric serovar Typhimurium* in the chicken. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, Londres, v.36, n.3, p.199-203, 2007.

JOYS, T. M. The covalent structure of the phase-1 flagellar filamentprotein of *Salmonella typhimurium* and its comparison with other flagellins. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 29, p.15758-15761, 1985.

JOYS, T. M.; SCHODEL, F. Epitope mapping of the d flagellar antigen of *Salmonella muenchen*. **Infection and immunity**, Washington, v. 59, n.9, p. 3330-3332, 1991.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiology**, Reading, v.12, p.3217-3226, 2000.

KARLINSEY, J. E.; SHUGO TANAKA, S.; BETTENWORTH, V.; YAMAGUCHI, S.; BOOS, W.; AIZAWA, S. I.; HUGHES, K. T. Completion of the hook-basal body ofthe *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. **Molecular microbiology**, Oxford, v.37, n.5, p.1220-1231, 2000.

KHORAMIAN-FALSAFI, T.; HARAYAMA, S.; KUTSUKAKE, K.; PECHERE, J.C. Effect of motility and chemotaxis on the invasion of *Salmonella typhimurium* into HeLa cells. **Microbial pathogenesis**, Londres, v.9, n.1, p.47-53, 1990.

KOBAYASHI, K. S.; CHAMAILLARD, M.; OGURA, Y.; HENEGARIU, O.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G.; FLAVELL, R. A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science**, Washington, v.307, n.5710, p.731-734, 2005.

KOGUT, M. H.; HE, H.; KAISER, P. Lipopolysaccharide binding protein/CD14/ TLR4-dependent recognition of salmonella LPS induces the functional activation of chicken heterophils and up-regulation of pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in these cells. **Animal biotechnology**, Londres, v.16, n.2, p.165-181, 2005.

KUTSUKAKE, K.; IDE, N. Transcriptional analysis of the *flgK* and *fliD* operons of *Salmonella typhimurium* which encode flagellar hook-associated proteins. **Molecular and general genetics**, Berlin, v. 247, n.3, p.275–281, 1995.

LI, J.; SMITH, N. H.; NELSON, K.; CRICHTON, P. B.; OLD, D. C.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R.K. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v.38, n.2, p.129-139, 1993.

LIU, X.; MATSUMURA, P. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. **Journal of bacteriology**, Washington, v.176, n.23, p.7345-7351, 1994.

LIU, X.; MATSUMURA, P. Differential regulation of multiple overlapping promoters in flagellar class II operons in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, Washington, v. 21, n.3, p.613-620, 1996.

LYONS, S.; WANG, L.; CASANOVA, J. E.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D.; GEWIRTZ, A. T. Salmonella typhimurium transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 117, p.5771-5780, 2004.

MACKINNON, K. M.; HE, H.; NERREN, J. R.; SWAGGERTY, C. L.; GENOVESE, K. J.; KOGUT, M. H. Expression profile of toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old Salmonella enteritidis-infected broiler chickens. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v.137, n.3-4, p.313-319, 2009.

MACNAB, R. M. Genetics biogenesis of bacterial flagella. **Annual review of genetics**, Palo Alto, v.26, p.131-158, 1992.

MACNAB, R. M. Flagella and motility. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS III, R.; GROSS, C. A.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; JR.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**, 2<sup>nd</sup> ed. Washington DC: ASM Press, 1996. p. 123-146.

MACNAB, R. M. How bacteria assemble flagella. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.57, p.77-100, 2003.

MARIATHASAN, S.; NEWTON, K.; MONACK, D. M.; VUCIC, D.; FRENCH, D. M.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; ERICKSON, S.; DIXIT, V. M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, Londres, v.430, n.6996, p.213-218, 2004.

MASSÉ, E.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. **Current opinion in microbiology**, Londres, v.6, n.2, p.120-124, 2003.

MASTROENI, P.; MENAGER, N. Development of acquired immunity to Salmonella. **Journal of medical microbiology**, Reading, v.52, 453-459, 2003.

MEDVEDEV, A. E.; SABROE, I.; HASDAY, J. D.; VOGEL, S. N. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. **Journal of endotoxin research**, Los Angeles, v.12, n.3, p.133-150, 2006.

METCALFE, H. J.; BEST, A.; KANELLOS, T.; LA RAGIONE, R. M.; WERLING, D. Flagellin expression enhances Salmonella accumulation in TLR5-positive macrophages. **Developmental and comparative immunology**, Tarrytown, v.34, n.8, p.797-804, 2010.

MIAO, E. A.; ANDERSEN-NISSEN, E.; WARREN, S. E.; ADEREM, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. **Seminars in immunopathology**, Berlin, v.29, n.3, p.275-288, 2007.

MINAMINO, T.; CHU, R.; YAMAGUCHI, S.; MACNAB, R. M. Role of FliJ in flagellar protein export in Salmonella. **Journal of bacteriology**, Washington, v.182, n.15, p.4207-4215, 2000.

MIZEL, S. B.; BATES, J. T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. **Journal of immunology**, Bethesda, v.185, n.10, p.5677-5682, 2010.

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI, A.; FERNANDES, A. C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian journal of microbiology**, São Paulo, v.36, p.51-56, 2005.

OSMAN, K. M.; ALI, M. M.; RADWAN, M. I.; KIM, H. K.; HAN, J. Comparative proteomic analysis on Salmonella Gallinarum and Salmonella Enteritidis exploring proteins that may incorporate host adaptation in poultry. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v.72, n.5, p.815-821, 2009.

PADALON-BRAUCH, G.; HERSHBERG, R.; ELGRABLY-WEISS, M.; BARUCH, K.; ROSENSHINE, I.; MARGALIT, H.; ALTUVIA, S. Small RNAs encoded within genetic islands of Salmonella typhimurium show host-induced expression and role in virulence. **Nucleic acids research**, Oxford, v.36, n.6, p.1913 -1927, 2008.

PAUL, K.; HARMON, J. G.; BLAIR, D. F. Mutational analysis of the flagellar rotor protein FliN: identification of surfaces important for flagellar assembly and switching. **Journal of bacteriology**, Washington, v.188, n.14, p. 5240-5248, 2006.

PARKER, C. T.; GUARD-PETTER, J. Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in chicks. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.204, n.2, p.287-291, 2001.

PASCOPELLA, L.; RAUPACH, B.; GHORI, N.; MONACK, D.; FALKOW, S.; SMALL, P. L. Host Restriction Phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. **Infection and immunity**, Washington, v.63, n.11, p.4329-4335, 1995.

PAULIN, S. M.; WATSON, P. R.; BENMORE, A. R.; STEVENS, M. P.; JONES, P. W.; VILLARREAL-RAMOS, B.; WALLIS, T. S. Analysis of *Salmonella enterica* Serotype-host Specificity in Calves: Avirulence of *S. enterica* serotype Gallinarum Correlates with Bacterial Dissemination from Mesenteric Lymph Nodes and Persistence In Vivo. **Infection and immunity**, Washington, v.70, n.12, p.6788-6797, 2002.

PALLEN, M. J.; MATZKE, N. J. From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. **Nature reviews Microbiology**, Londres, v.4, n.10, p.784-790, 2006.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acid research**, Oxford, v.29, n. 9, e 45, 2001.

PLYM-FORSHELL, L.; WIERUP, M. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue scientifique et technique / Office international des épizooties**, Paris, v.25, n.2, p.541-554, 2006.

POMEROY, B. S.; NAGARAJA, K. V. Fowl typhoid. IN: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID W. M.; YODER JR, H. W. (Ed.). **Diseases of Poultry 9<sup>th</sup> edn**. London: Wolfe Publishing Ltd, 1991.p.87-99.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Kauffmann- White Scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 147, n. 39, P. 765-769, 1996. Supplement.

PORWOLLIK, S.; SANTIVIAGO, C. A.; CHENG, P.; FLOREA, L.; JACKSON, S.; MCCLELLAND, M. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. **Journal of bacteriology**, Washington, v.187, n.18, p.45-55, 2005.

QIUCHUN, L.; XU, Y.; JIAO, X. Identification of *Salmonella pullorum* genomic sequences using suppression subtractive hybridization. **Journal of microbiology and biotechnology**, Seoul, v.19, n.9, p.898-893, 2009.

ROBERTSON, J. M.; MCKENZIE, N.H.; DUNCAN, M.; ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M. J.; FLINT, H. J.; GRANT, G. Lack of flagella disadvantages *Salmonella enterica* serovar Enteritidis during the early stages of infection in the rat. **Journal of medical microbiology**, Reading, v.52, p.91-99, 2003.

SAMATEY, F. A.; IMADA, K.; NAGASHIMA, S.; VONDERVISZT, F.; KUMASAKA, T.; YAMAMOTO M.; NAMBA, K. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. **Nature**, Londres, v. 410, n. 6826, p. 331-337, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. In: Cold spring harbor (Ed). A Laboratory Manual. New York, 2001, v.1, p. 31-50.

SHAH, D. H.; ZHOU, X.; ADDWEBI, T.; DAVIS, M. A.; ORFE, L.; CALL, D. R.; GUARD, J.; BESSER, T.E. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, Reading, v.157, p.1428-1445, 2011.



SHIVAPRASAD, H. L. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v.19, n.2, p.406-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum disease and fowl typhoid. In: Saif, Y. M.; Fadley, A. M.; Glisson, J. R.; McDougald, L. R.; Nolan, L. K.; Swayne. D. E. (Ed.). **Diseases of poultry 12<sup>th</sup> ed.** Ames: Iowa State Press, 2008. p.620-634.

SIMON, R.; SAMUEL, C. Activation of NF- $\kappa$ B-dependent gene expression by Salmonella flagellins FliC and FljB. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 355, n.1, p. 280-285, 2007.

SITTKA, A.; LUCCHINI, S.; PAPENFORT, K.; SHARMA, C. M.; ROLLE, K.; Binnewies, T. T. Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. **PLoS Genetics**, San Francisco, v.4, n.8, 2008.

SMITH, A. L.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. (Ed.). **Avian Immunology**. Londres: Academic Press, 2008. p. 243-271.

SMITH, C. K.; KAISER, P.; ROTHWELL, L.; HUMPHREY, T.; BARROW, P. A.; JONES, M. A. Campylobacter jejuni-induced cytokine responses in avian cells. **Infection and immunity**, Washington, v.73, n.4, p.2094-2100, 2005.

SMITH, H. W. Observations on experimental fowl typhoid. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.65, n.1, p.37-54, 1955.

SMITH, N.H.; SELANDER, R.K. Sequence invariance of the antigen-coding central region of the phase 1 flagellar. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 172, n.2, p. 603-609, 1990.

STEINBACH, G.; LAUTERBACH, L.; METHNER, U. Studies of the phenomenon of host adaptation in Salmonella. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, Berlin, v.47, n.9, p.707-719, 2000.

SUBRAMANIAN, N.; QADRI, A. Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella. **Nature Immunology**, Londres, v.7, n.6, p.583-589, 2006.

SUN, Y.,H.; ROLÁN, H. G.; TSOLIS, R. M. Injection of flagellin into the host cell cytosol by Salmonella enterica serotype Typhimurium. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.282, n.47, p.33897-33901, 2007.

TALLANT, T.; DEB, A.; KAR, N.; LUPICA, J.; DE VEER, M. J.; DIDONATO, J. A. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. **BMC microbiology**, Londres, v.4, p.33, 2004.

TOMINAGA, A.; KUTSUKAKE, K. Expressed and cryptic flagellin in the H44 and H55 type strains of *Escherichia coli*. **Genes and genetic systems**, Mishima, v. 82, n.1, p. 1-8, 2007.

THOMSON, N. R.; CLAYTON, D. J.; WINDHORST, D.; VERNIKOS, G.; DAVIDSON, S.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; STEVENS, M.; JONES, M. A.; WATSON, M.; BARRON, A.; LAYTON, A.; PICKARD, D.; KINGSLEY, R. A.; BIGNELL, A.; CLARK, L.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; ABDELLAH, Z.; BROOKS, K.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; WOODWARD, J.; NORBERCZAK, H.; LORD, A.; ARROWSMITH, C.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; SANDERS, M.; WHITEHEAD, S.; CHABALGOITY, J. A.; MASKELL, D.; HUMPHREY, T.; ROBERTS, M.; BARROW, P. A.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome research**, Cold Spring Harbor, v.18, n.10, p.1624-1637, 2008.

UEMATSU, S.; JANG, M. H.; CHEVRIER, N.; GUO, Z.; KUMAGAI, Y.; YAMAMOTO, M.; KATO, H.; SOUGAWA, N.; MATSUI, H.; KUWATA, H.; HEMMI, H.; COBAN, C.; KAWAI, T.; ISHII, K. J.; TAKEUCHI, O.; MIYASAKA, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. **Nature immunology**, Londres, v.7, n.8, p.868-874, 2006.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASADESÚS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.125, n.2, p.229-255, 2000.

UZZAU, S.; LEORI, G. S.; PETRUZZI, V.; WATSON, P. R.; SCHIANCHI, G.; BACCIU, D.; MAZZARELLO, V.; WALLIS, T. S.; RUBINO, S. *Salmonella enterica* Serovar-host Specificity Does Not Correlate with the Magnitude of Intestinal Invasion in Sheep. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n.5, p.3092-3099, 2001.

VAN ASTEN, F. J.; HENDRIKS, H. G.; KONINKX, J. F.; VAN DER ZEIJST, B. A.; GAASTRA, W. Inactivation of the flagellin gene of *Salmonella enterica* serotype enteritidis strongly reduces invasion into differentiated Caco-2 cells. **FEMS microbiology letters**, Oxford, v.185, n.2, p.175-179, 2000.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P. A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v.133, n. 6, p.959-978, 2005.

WALLIS, T. S.; WOOD, M.; WATSON, P.; PAULIN, S.; JONES, M.; GALYOV, E. Sips, Sops, and SPIs but not stn influence *Salmonella* enteropathogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Nova lorque, v.473, p.275-280, 1999.

WASSARMAN, K. M. Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. **Cell**, Cambridge, v. 109, n.2, 2002.

WIGLEY, P.; BERCHIERI JR. A.; PAGE, K. L.; SMITH, A. L.; BARROW, P. A. Salmonella enterica serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. **Infection and immunity**, Washington, v.69, n.12, p.7873-7879, 2001.

WIGLEY, P.; HULME, S. D.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P. A. In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 "locus". **Microbes and infection / Institut Pasteur**, Paris, v.4, n.11, p.1111-1120, 2002a.

WIGLEY, P.; JONES, M. A.; BARROW, P. A. Salmonella enterica serovar Pullorum requires the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system for virulence and carriage in the chicken. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, Londres, v.31, n.5, p.501-506, 2002b.

WIGLEY, P.; KAISER, P. Avian cytokines in health and disease. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.5, n.1, p.1-14, 2003.

WIGLEY, P.; HULME, S.; POWERS, C.; BEAL, R.; SMITH, A.; BARROW, P. A. Oral infection with the Salmonella enterica serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC veterinary research**, Londres, v.1, n.2, 2005.

WIGLEY, P.; HULME, S.; ROTHWELL, L.; BUMSTEAD, N.; KAISER, P.; BARROW, P. A. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic

salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. **Infection and immunity**, Washington, v.74, n.2, p.1425-1430, 2006.

WING, J. P. Transduction by phage P22 in a recombination-deficient mutant of *Salmonella Typhimurium*. **Virology**, Nova Iorque, v.36, n.2, p.271-276, 1968.

WITHANAGE, G. S.; KAISER, P.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; MASTROENI, P.; BROOKS, H.; BARROW, P.; SMITH, A.; MASKELL, D.; MCCONNELL, I. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Infection and immunity**, Washington, v.72, n.4, p.2152-2159, 2004.

WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; KAISER, P.; MASTROENI, P.; BROOKS, H.; POWERS, C.; BEAL, R.; BARROW, P.; MASKELL, D.; MCCONNELL, I. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and immunity**, Washington, 73, n.8, p.5173-5182, 2005.

WOODWARD, M.J.; GETTINBY, G.; BRESLIN, M. F.; CORKISH, J. D.; HOUGHTON, S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. **Avian pathology**, Londres, v.3, n.4, p.383-392, 2002.

YAMAMOTO, S.; KUTSUKAKE, K. FljA-mediated post-transcriptional control of phase-1 flagelin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 188, n.3, p. 958-967, 2006.

YANAGIHARA, S.; IYODA, S.; OHNISHI, K.; IINO, T.; KUTSUKAKE, K. Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. **Genes and genetic systems**, Mishima, v.74, n.3, p.105-111, 1999.

YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA, S.; NAMBA, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. **Nature**, Londres, v. 424, n.6949, p. 643-650, 2003.

ZANCAN, F. B.; BERCHIERI JR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* spp investigation in transport box of day old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.3, p. 230-232, 2000.

ZENG, H.; CARLSON, A. Q.; GUO, Y.; YU, Y.; COLLIER-HYAMS, L. S.; MADARA, J.L.; GEWIRTZ, A. T.; NEISH, A. S. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, Bethesda, v. 171, n.7, p. 3668-74, 2003.

ZEUGIN, J. A.; HARTLEY, J. L. Ethanol precipitation of DNA. **Focus**, Gaithersburg, v.7, n.4, p.1-2, 1985.

ZHANG, S.; LILLEHOJ, H. S.; KIM, C. H.; KEELER, C. L. JR.; BABU, U.; ZHANG, M. Z. Transcriptional response of chicken macrophages to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. **Developments in biologicals**, Basel, v.132, p.141-151, 2008.

## APÊNDICE

## 1. Exemplo de cálculo do peso molecular de *amplicons* das estirpes de *Salmonella* spp. para confirmação da mutação

Para exemplo utilizou-se o gene *fliC* de SE. Primeiramente, deve-se visualizar o genoma de SE (Figura 1A) no software Artemis v11 (CARVER et al., 2005) e, em seguida, localizar o gene alvo (Figura 2A). Com ajuda do mouse ou por meio das ferramentas do software, selecionar a sequência do gene alvo, juntamente parte das sequências adjacentes ao mesmo (Figura 3A). Iniciar o software CLC *sequence viewer* 6.3 (CLC BIO) e, a seguir, copiar e colar a sequência, previamente selecionada, no campo “*enter sequence data*” (Figura 4A). Repetir o mesmo procedimento com as sequências dos iniciadores de controle direto e reverso e com as 50 primeiras bases nitrogenadas dos iniciadores de mutagênese direto e reverso. Iniciar a sequência do iniciador de controle reverso, ir ao campo “*toolbox*”, escolher a opção “*Nucleotide analyses*” e, em seguida, escolher a opção “*reverse complement sequence*”. Repetir o procedimento para as 50 bases do iniciador de mutagênese reverso. A obtenção da sequência complementar dos iniciadores reversos facilitará a visualização da posição das mesmas na sequência direta do gene.

Com a sequência do gene aberta, copiar a sequência do iniciador controle direto e colar no campo “*find*”, escolher a opção “*find*” (Figura 5A). Anotar as posições da primeira e última base nitrogenada do iniciador de controle direto. Repetir o procedimento para as 50 primeiras bases do iniciador de mutagênese direto, anotando as posições da primeira e última base. Utilizando-se o campo “*find*”, visualizar as posições da sequência complementar do iniciador de controle reverso e da sequência complementar das 50 bases do iniciador de mutagênese reverso, anotando as posições das primeiras e últimas bases. Veja Figura 6A.

Após a localização dos iniciadores na fita de DNA, é possível calcular o peso molecular dos fragmentos que serão amplificados pela PCR com os dois iniciadores de controle. Para obtenção do peso molecular dos *amplicons*, antes da mutação, deve-se subtrair a posição (346) da primeira base nitrogenada, onde o iniciador de controle direto (*fliC* ctrD) se anela, da posição (2200) da última base do iniciador de controle



reverso (*fliC* ctrR). O fragmento amplificado antes da mutação tem 1,8 Kb de peso molecular. Para o cálculo do fragmento após a mutação, deve-se conhecer o tamanho do fragmento que será inserido (o cassete de cloranfenicol tem peso molecular de 1 Kb) e o tamanho da região entre as 50 primeiras bases do iniciador direto de mutagênese e as 50 primeiras bases nitrogenadas no iniciador reverso de mutagênese ( $2083 - 534 = 1559$ ; aprox 1,5 Kb). Neste caso, na mutação do gene *fliC* em SE, um fragmento de 1 Kb substituiu o fragmento original que era de 1,5 kb. Deste modo, após a mutação, o fragmento terá peso molecular de aproximadamente 1,3 Kb (500 pb a menos) contra 1,8 Kb do original (Figura 7A).

Normalmente, realiza-se o cálculo do peso molecular apenas para os *amplicons* resultantes da PCR com os dois iniciadores de controle. Do mesmo modo, é possível o cálculo dos *amplicons* da PCR com as combinações entre iniciadores controle (*fliC* ctrD e *fliC* ctrR) e daqueles construídos para se ligarem aos cassetes (C1 e C2). Para isso, deve-se montar a sequência do gene mutado e localizar a posição de todos os iniciadores (*fliC* ctrD, *fliC* ctrR, C1 e C2). O gene mutado possui a região entre as 50 primeiras bases do iniciador direto de mutagênese e as 50 primeiras bases nitrogenadas do iniciador reverso de mutagênese, substituída pela sequência do cassete inserido.

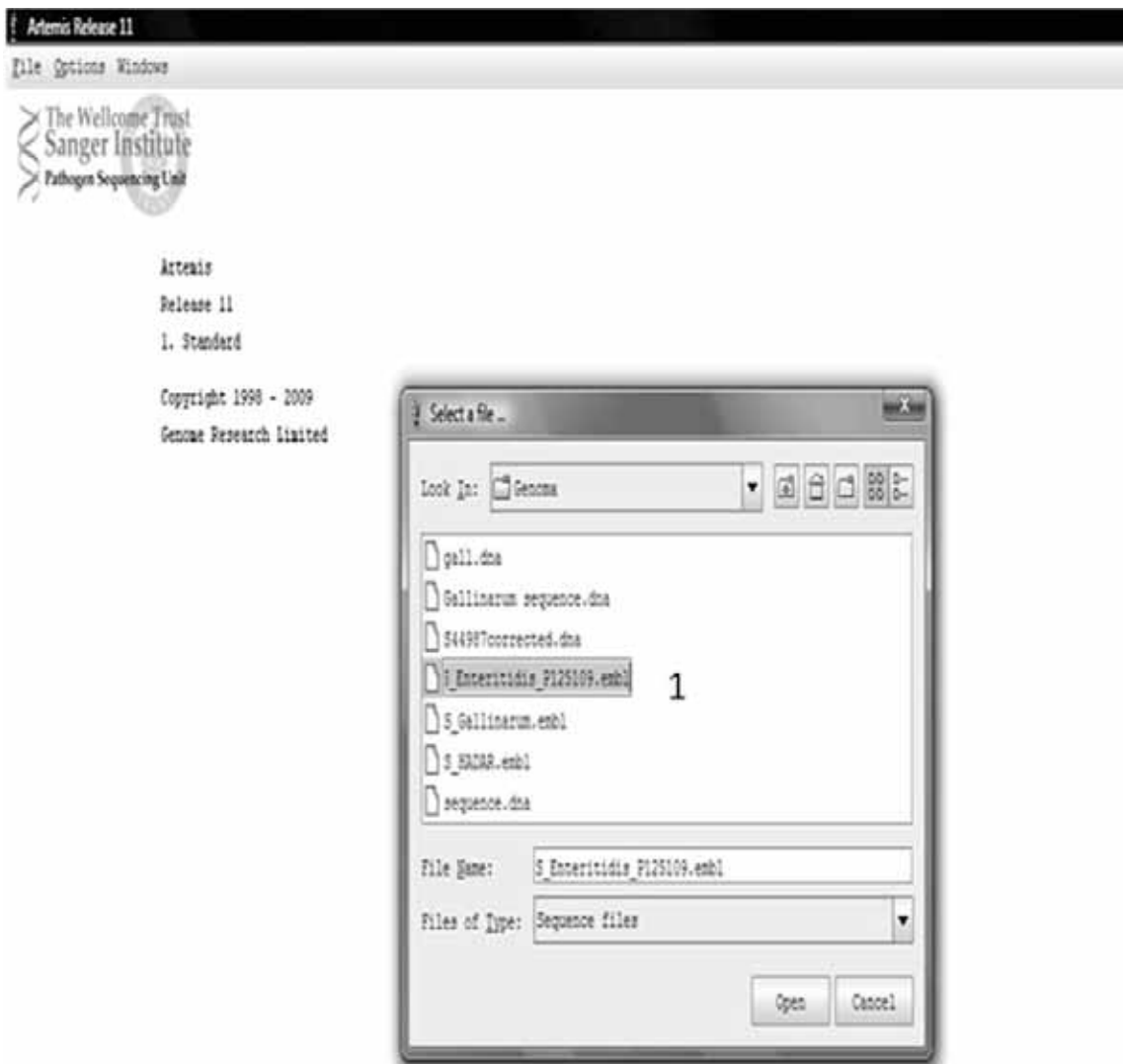


Figura 1A. Tela inicial do software Artemis 11. Comando utilizado (1) para abertura e visualização da sequência do genoma de SE.

The screenshot shows the Artemis v11 software interface. At the top, the title bar reads "Artemis Entry Edit 5\_Enteroids\_P125109.embl". Below the title bar, there are menu options: "File Entries Select View Goto Edit Create Run Graph Display". The "Entry:" field contains "5\_Enteroids\_P125109.embl". The "Selected Features:" field shows "bases 1518 amino acids 505 flsC (/transl\_table=11 /locus\_tag="XKX1049" /product="Flagellin" /protein\_id="CAP03634.1" /translation".

The main display area shows a genomic map with a scale from 0 to 1149300. A gene model is shown with a single gene labeled "1" between coordinates flsC and flsB. Below the map, there are several tracks showing sequence alignments and annotations. The sequence is displayed in a monospaced font, with a highlighted region corresponding to the gene "1".

At the bottom of the interface, a list of annotations is shown:

Feature Type	Coordinates	Description
CDS	1146600 1148117	
misc_feature	1146694 1147091	HMMFam hit to PF00669, Flagellin, N-terminal, score 4.1e-81
misc_feature	1147933 1148040	HMMFam hit to PF00700, Flagellin, C-terminal, score 8.4e-40
CDS	1148196 1149401	
CDS	1148598 1150317	
misc_feature	1148643 1148864	HMMFam hit to PF04542, RNA polymerase sigma-70 region 3, score 5.2e-19
misc_feature	1148924 1149765	P900715 Sigma-70 factors family signature 1.
misc_feature	1148965 1150113	HMMFam hit to PF04539, RNA polymerase sigma-70 region 3, score 9.4e-22
misc_feature	1150150 1150299	HMMFam hit to PF04545, RNA polymerase sigma-70 region 4, score 5.6e-20
misc_feature	1150213 1150293	P900716 Sigma-70 factors family signature 2.

Figura 2A. Tela do software Artemis v11. Localização do gene alvo (1).

The figure consists of two screenshots of the Artemis v11 software interface, illustrating the process of selecting a gene and its surrounding regions for visualization.

**Top Screenshot (1):** Shows the main interface with the gene *S\_Enteritidis\_P125109.embl* selected. The top panel displays the genomic map with features like *flilc* and *flilb* highlighted. A red box labeled '1' indicates the selected region. The bottom panel shows the protein sequence and associated features, including CDS and misc\_feature entries with their respective coordinates and descriptions.

**Bottom Screenshot (2):** Shows the same interface with a 'Selected bases' dialog box open. The dialog box displays the nucleotide sequence of the selected region, with a red box labeled '2' indicating the selected text. The background interface shows the genomic map and protein sequence, with the selected region highlighted in red.

The 'Selected bases' dialog box contains the following sequence:

```

ggtcaactgagttacgctcaaccacaaagtccaggtgagggccagctccogtgcagac
tttccggtctctctgactgctggtgacattgacttttaaacagatcggctttattta
ggcgggttttctggtttgaaactctccatgcaatttttaaacagatcggctttattta
agggcgctattgacgctctcctgctgctggtgagctcaggtcctctttccaggtgt
ggtcagttttagtcagcagctgactcagcaggtgaggttgcacctccatcagcagcagc
tgaagcactgcaactctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
ggagcagcagtttaactgcaattttgcacaaactgctgagcagcagcagcagcagcagc
ggctattctgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ttcaggtgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gttctattgctagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ttgcacacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
tctctggtctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
ggctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
agcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ttcaactgcaactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
gttcaactgcaactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
gttcaactgcaactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
cagttcaactgcaactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
tctactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg

```

Figura 3A. Tela do software Artemis v11. Seleção da sequência do gene alvo juntamente com as regiões adjacentes (1) para posterior visualização (2).



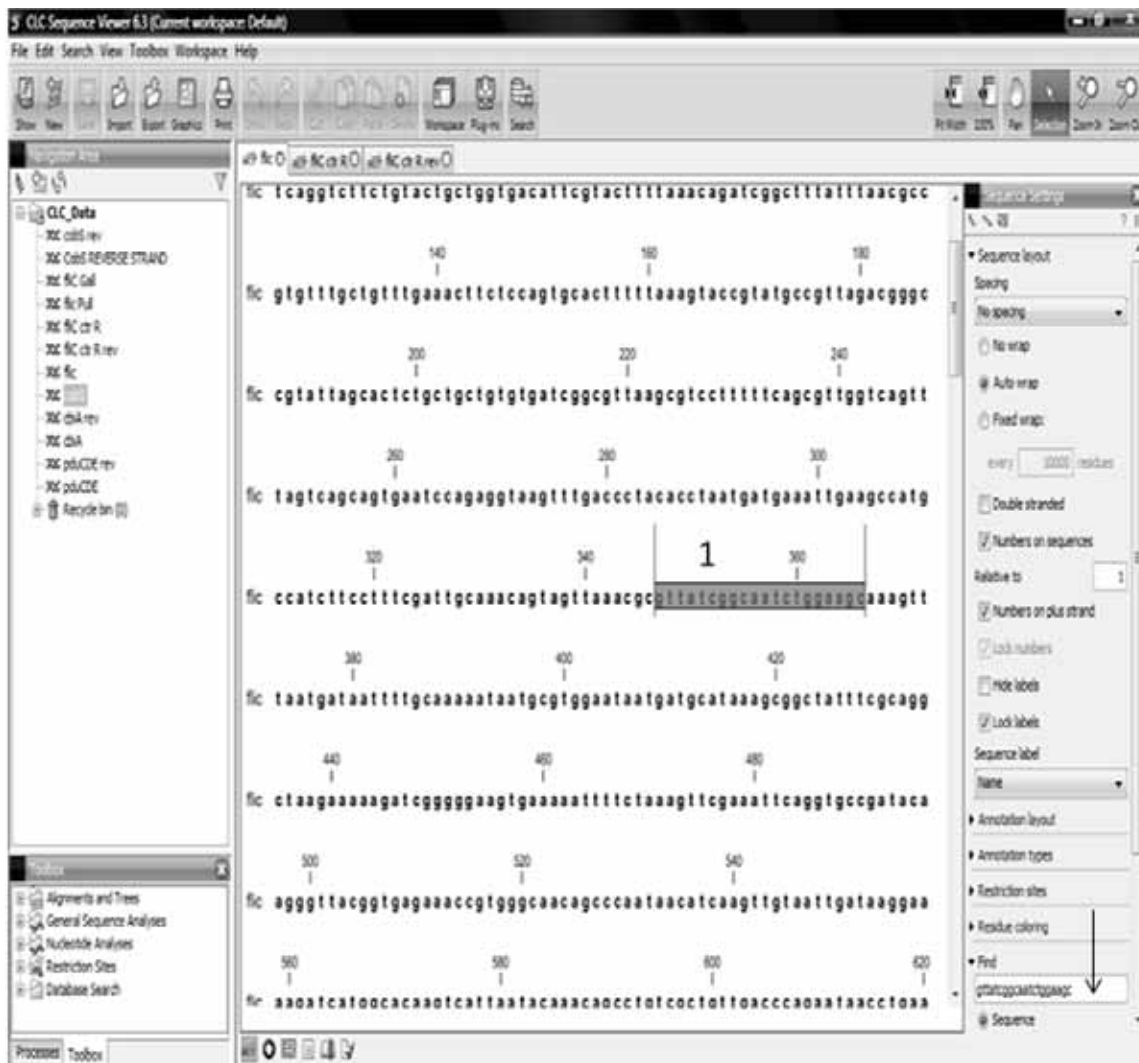


Figura 5A. Tela do software CLC *sequence viewer* 6.3. Seta indica o campo onde a sequência do iniciador deve ser colada para posterior visualização (1).

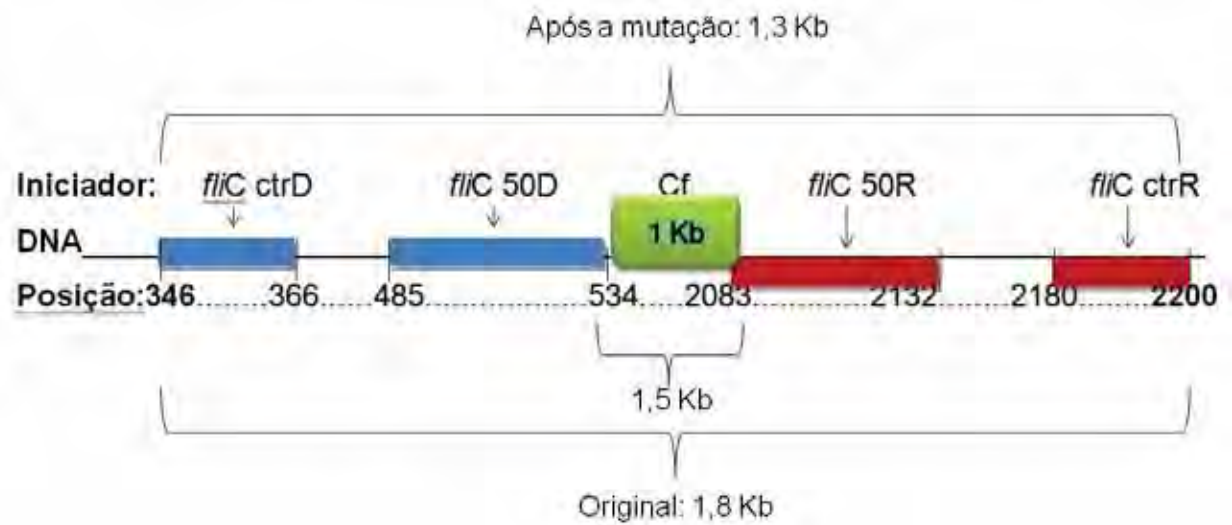


Figura 6A. Posicionamento dos iniciadores na fita direta do DNA do gene para cálculo do peso molecular dos fragmentos a serem amplificados.



Figura 7A. Eletroforograma em agarose 1%. Produtos da PCR do gene *fliC* com três combinações de iniciadores. SE 1 e 2: colônias de SE mutantes. SE.s: Estirpe selvagem. CN: controle negativo. MW: Marcador de tamanho molecular (1 Kb plus DNA Ladder NEW ENGLAND BioLabs).