

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**PARTICIPAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO PROCESSO DE RESPIRAÇÃO
ANAERÓBICA NA INFECÇÃO DE AVES POR *Salmonella* TYPHIMURIUM**

Yuli Melisa Sierra Arguello
Médica Veterinária

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL

Dezembro de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**PARTICIPAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO PROCESSO DE RESPIRAÇÃO
ANAERÓBICA NA INFECÇÃO DE AVES POR *Salmonella* TYPHIMURIUM**

Yuli Melisa Sierra Arguello

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior.

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

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL

Dezembro de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

YULI MELISA SIERRA ARGUELLO- Nascida em 22 de abril de 1983, natural de Bucaramanga, estado de Santander, Colômbia, é formada em Medicina Veterinária e Zootecnia no ano de 2005, pela Universidade Pedagógica e Tecnológica da Colômbia, Faculdade de Ciências Agropecuárias.



“Não deixe que seus medos tornem-se obstáculos no caminho de seus sonhos...”



*A todos aquellos que me aman
A quienes sin amarme me aprecian
A quienes sin apreciarme me respetan
A quienes sin respetarme me toleran
A quienes sin tolerarme me recuerdan.*

*A Dios, a Yolanda, Milton y Julián Camilo,
A mis queridas Luz y Oliva.
A mi dulce inspiración...
A todos esos amigos incondicionales
Por su compañía inagotable
En mi mar de sueños.*

DEDICO~

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Resumo.....	viii
Summary.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Salmoneloses Aviárias.....	3
2.2. Metabolismo bacteriano.....	7
2.3. Respiração bacteriana.....	9
2.3.1. Anaerobiose.....	10
2.3.1.1. Componentes respiratórios.....	10
III. OBJETIVOS.....	20
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Preparo de mutantes para estudo de genes envolvidos no processo de respiração anaeróbica.....	21
4.1.1. Desenho dos <i>primers</i>	21
4.1.2. Procedimento experimental para preparo dos mutantes.....	23
4.1.2.1. Preparo do gene defeutivo.....	23
4.1.2.2. Inserção do gene no plasmídio p-Gem easy vector.....	25

4.1.2.3. Extração do plasmídio p-Gem easy vector de <i>E. coli</i> JM109.....	26
4.1.2.4. Digestão enzimática.....	26
4.1.2.5. Adição do gene que confere à bactéria resistência ao antibiótico e inserção no plasmídio p-Gem easy vector.....	27
4.1.2.6. Extração do plasmídio p-Gem easy vector de <i>E. coli</i> JM109 e digestão enzimática.....	28
4.1.2.7. Ligação do gene defectivo no plasmídio JCB12.....	28
4.1.2.8. Transferência de p-JCB12 (C ^r e Can ^r ou Spc ^r) para <i>E. coli</i> S17.1 λ pir.....	30
4.1.2.9. Conjugação do gene defectivo (Can ^r ou Spc ^r) em <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	31
4.2. Transdução.....	31
4.3. Ensaio <i>in vivo</i>	33
4.3.1. Amostras bacterianas.....	33
4.3.2. Preparo dos inóculos de <i>Salmonella</i> Typhimurium...33	
4.3.3. Aves.....	34
4.3.4. Infecção de aves por mutantes de STM contendo genes ..defectivos relacionados ao sistema de respiração anaeróbica.....	34
4.3.4.1. Experimento 1.....	34
4.3.4.2. Experimento 2.....	35
4.4. Análise estatística.....	36

V.	RESULTADOS.....	37
5.1.	Preparo de mutantes de STM para estudo de genes envolvidos no processo de respiração anaeróbica.....	37
5.2.	Infecção de aves por mutantes de STM contendo genes defectivos relacionados ao sistema de respiração anaeróbica.....	42
5.2.1.	Experimento 1.....	42
5.2.2.	Experimento 2.....	46
VI.	DISCUSSÃO.....	50
VII.	CONCLUSÕES.....	58
VIII.	REFERÊNCIAS.....	59

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Pesos moleculares (PM) do gene original e do gene defeutivo <i>napA</i> , <i>narG</i> , <i>frdA</i> , <i>cbiA</i> , <i>cobS</i> , <i>torC</i> e <i>dmsA</i>	33
Tabela 2- Mortalidade de aves infectadas com cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium contendo genes defeitivos associados à respiração anaeróbica, desafiadas com cultura diluída a 10^{-3} , contendo aproximadamente 10^5 CFU/mL.....	45
Tabela 3- Mortalidade de aves infectadas com cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium contendo genes defeitivos associados à respiração anaeróbica, desafiadas com cultura diluída a 10^{-2} , contendo aproximadamente 10^6 CFU/mL.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Etapas iniciais do preparo do gene defectivo.....	37
Figura 2- Eletroforograma apresentando a amplificação do gene <i>cbiA</i> de STM em gel de agarose a 1%. MW: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 5: fragmento STM $\Delta cbiA$ Can^r (1930bp). Bandas 6 e 7: fragmento STM <i>cbiA</i> (original) (1360bp).....	38
Figura 3- Eletroforograma apresentando a amplificação do gene <i>cobS</i> de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 6: fragmento STM $\Delta cobS$ Spc^r (2964bp). Bandas 7 e 8: fragmento STM <i>cobS</i> (original) (994bp).....	38
Figura 4 - Eletroforograma apresentando a amplificação do gene <i>torC</i> de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 5: fragmento STM $\Delta torC$ Can^r (2060bp). Bandas 6 e 7: fragmento STM <i>torC</i> (original) (1185bp).....	39
Figura 5- Eletroforograma apresentando a amplificação do gene <i>dmsA</i> de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 6: fragmento STM $\Delta dmsA$ Spc^r (3160bp). Bandas 7 e 8: fragmento STM <i>dmsA</i> (original) (2575bp).....	39

- Figura 6- Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *napA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 5: fragmento STM $\Delta napA$ Spc^r (3030bp). Bandas 6 a 8: fragmento STM *napA* (original) (2486bp)..... 40
- Figura 7 - Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *frdA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 4: fragmento STM $\Delta frdA$ Spc^r (3060bp). Bandas 5 a 8: fragmento *frdA* (original) (1790bp)..... 40
- Figura 8 - Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *narG* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 4: fragmento STM $\Delta narG$ Can^r (2013bp). Bandas 5 a 7: fragmento STM *narG* (original) (3743bp)..... 41
- Figura 9- Eletroforograma apresentado a amplificação dos genes *cobS* e *cbiA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 3: fragmento STM $\Delta cobS$ Spc^r (2964bp). Bandas 4 e 5: fragmento STM *cobS* (original) (994bp). Banda 6: *Salmonella* Typhimurium F98 *cobS* Spc^r (2964bp). Bandas 7, 8 e 9: fragmento STM $\Delta cbiA$ Can^r (1930bp). Bandas 10 e 11: fragmento STM *cbiA* (original) (1360bp). Banda 12 e 13: *Salmonella* Typhimurium F98 *cbiA* Can^r (1930bp)..... 41
- Figura 10- Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *torC* e *dmsA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 3: fragmento STM $\Delta torC$ Can^r (2060bp). Bandas 4 e 5: fragmento STM *torC* (original) (1185bp). Banda 6: *Salmonella* Typhimurium F98 $TorC^-$ Can^r (2060bp). Bandas 7, 8 e 9: fragmento STM $\Delta dmsA$ Spc^r (3160bp). Bandas 10 e 11: fragmento STM *dmsA* (original) (2575bp). Banda 12 e 13: *Salmonella* Typhimurium F98 *dmsA* Spc^r (3160bp)..... 42

	44
Figura 11- Alteração ocular em pintainho infectado com cultura de STM no 12 ^o dpi.....	
Figura 12- Comparação de aves do grupo controle infectadas com <i>Salmonella Typhimurium</i> , observe-se o fígado aumentado de tamanho e presença de pontos necróticos.....	46
Figura 13- Fígado encontra-se congesto, aumentado de tamanho e com presença de pontos necróticos de ave infectada com STM $\Delta cbiA$	49
Figura 14- Aves infectadas com STM $\Delta cobS$. (A) Ave com fígado e baço congesto, aumentado de tamanho e com presença de pontos necróticos. (B) Ave com fígado e baço normal.....	49

PARTICIPAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO PROCESSO DE RESPIRAÇÃO ANAERÓBICA NA INFECÇÃO DE AVES POR *Salmonella* TYPHIMURIUM

RESUMO- Patógenos intestinais são expostos a várias condições de estresse durante o ciclo de infecção. Anaerobiose é uma condição hostil oferecida pelo hospedeiro no intestino e lúmen intestinal, onde a sobrevivência, multiplicação e entrada nas células epiteliais é prioridade para a invasão do agente patogênico. A fumarato reductase (*frdABCD*), dimetil sulfoxido (DMSO)- *N*-óxido de trimetilamina (TMAO) reductase (*dmsABC*), e nitrato reductase (*narGHIJ*), são genes de *Salmonella* Typhimurium que codificam enzimas envolvidas na respiração anaeróbica de fumarato, DMSO ou TMAO, e nitrato, respectivamente. Eles são regulados em resposta à disponibilidade de nitrato, oxigênio e a taxa de crescimento celular. A vitamina B₁₂ (cobalamina) é sintetizada por *Salmonella* Typhimurium em condições anaeróbicas, sendo usado como cofator em quatro reações conhecidas. A deleção dos genes *cobS* e *cbiA* inibem a produção de cobalamina. No presente estudo, foi avaliada a infecção de aves por mutantes de STM, com o sistema respiratório comprometido por alterações nos genes *narG*, *napA*, *cobS*, *cbiA*, *frdA*, *dmsA* e *torC*. Aves de um dia de idade, foram inoculadas com 0.1 mL de cultura de *Salmonella* Typhimurium contendo 10⁸ UFC/mL, diluída a 10⁻² e 10⁻³. Sinais clínicos e mortalidade foram avaliados durante 21 dias. Em geral, os sintomas das aves infectadas com as cepas mutantes foram semelhantes aos apresentados pelas aves do grupo controle. Com exceção de STM *cbiA*, os demais mutantes reduziram a capacidade de causar mortalidade em comparação com a cepa original. A mortalidade do grupo de aves infectadas com STM $\Delta narG$, STM $\Delta frdA$, STM $\Delta dmsA$ e STM $\Delta cobS\Delta cbiA$, apresentaram diminuição significativa da mortalidade em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$).

KEY-WORDS: *Salmonella* Typhimurium, respiração, anaeróbica, gene.

PARTICIPATION OF GENES INVOLVED IN THE PROCESS OF ANAEROBIC RESPIRATION OF INFECTION IN CHICKENS BY *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

SUMMARY- Intestinal pathogens are exposed to various stress conditions during their infectious cycle. Anaerobiosis, one of such hostile condition, is offered by the host within gut and intestinal lumen, where survival, multiplication and entry into intestinal epithelial cells are priority for the invasion of the pathogen. The fumarate reductase (*frdABCD*), dimethyl sulfoxide (DMSO)-trimethylamine *N*-oxide (TMAO) reductase (*dmsABC*), and nitrate reductase (*narGHIJ*) operons in *Salmonella* Typhimurium (STM) encode enzymes involved in anaerobic respiration to the electron acceptors fumarate, DMSO, TMAO, and nitrate, respectively. They are regulated in response to nitrate and oxygen availability and changes in cell growth rate. Vitamin B₁₂ (cobalamin) is synthesized by *Salmonella* Typhimurium only under anaerobic growth conditions used as a cofactor in four known reactions. The deletion of *cobS* and *cbiA* genes prevent any form of cobalamin production. In the present study we evaluate the infection of birds by mutants of STM, with the anaerobic respiratory system committed by mutations in the genes: *narG*, *napA*, *cobS*, *cbiA*, *frdA*, *dmsA*, and *torC*. Virulence was assessed by oral inoculation of groups of one-day-old broilers with 0.1 mL of culture contained 10⁸ CFU/mL or diluted at 10⁻³ and 10⁻² of strains mutants of *Salmonella* Typhimurium. Clinical signs and mortality were recorded over a period of 21 days. In general, the symptoms of chickens infected with the mutant strains were similar to those presenting by control birds. Except for STM Δ *cbiA*, all showed reduced capacity to cause mortality in comparison with the original strain. The mortality of group of chickens infected with STM Δ *narG*, STM Δ *frdA*, STM Δ *dmsA* and STM Δ *cobS Δ *cbiA* showed significant decrease in mortality compared to control group ($p < 0.05$).*

KEY-WORDS: *Salmonella* Typhimurium, respiration, anaerobic, gene.

I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da avicultura, decorrente da evolução genética das aves, da nutrição e do sistema de manejo, propicia a produção avícola em grande escala. No entanto, o sistema de confinamento adotado favorece a introdução e disseminação de agentes patogênicos. Neste contexto, incluem-se as salmonelas que são responsáveis por enfermidades aviárias e, por meio de produtos de origem avícola, podem causar doenças de origem alimentar em seres humanos.

Os microrganismos do gênero *Salmonella* têm distribuição mundial, constituindo-se em potencial problema para a saúde pública. Nos casos de infecções alimentares por *Salmonella*, tanto no Brasil quanto no exterior, os sorovares isolados com maior frequência têm sido *Salmonella* Enteritidis, seguido por *Salmonella* Typhimurium (STM). O conhecimento dos mecanismos pelos quais *Salmonella* infecta as aves, pode ajudar a compreender como este patógeno invade as células, se multiplica e impede a resposta imune do hospedeiro, podendo permanecer na ave, causando ou não a enfermidade. Informações sobre os processos biológicos fundamentais, moleculares e celulares, são importantes para o entendimento da relação hospedeiro-parasita, podendo auxiliar no diagnóstico, prevenção e controle da infecção.

A interação bactéria-hospedeiro durante o ciclo infeccioso de um parasita intracelular facultativo é um processo dinâmico, no qual o patógeno está exposto às adversidades de ambientes intra e extracelulares. Estas mudanças são percebidas pela bactéria provocando uma resposta que lhe permite se adaptar às novas condições para sobreviver (MEKALANOS, 1992).

O conhecimento a respeito do processo de respiração em anaerobiose é importante, no sentido de que a sobrevivência de *Salmonella* no organismo animal (ou mesmo em seres humanos), intracelularmente ou no trato entérico, ocorre em ambiente anaeróbico. Esta variabilidade no comportamento decorre de uma resposta rápida, relacionada à modificação na expressão genética.

Anaeróbios facultativos, assim como *Escherichia coli* (*E. coli*) e STM, podem crescer sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, obtendo energia por processos respiratórios ou fermentativos. Em geral, na ausência de oxigênio, o sistema respiratório tenta garantir que será adotado o processo metabólico energeticamente mais favorável utilizando aceptores disponíveis.

Por ser um microrganismo intracelular e pela sua importância como patógeno para animais e seres humanos, STM tem sido uma das salmonelas preferidas pelos microbiologistas moleculares para identificar e elucidar fatores biológicos bacterianos. Nos últimos anos, acumulam-se informações sobre os mecanismos de interação e patogenia de *Salmonella* com as células hospedeiras (KAUFMANN *et al.*, 2001). Esse conhecimento se deve, principalmente, à grande similaridade dessa bactéria com a *E. coli*, permitindo a utilização de instrumentos e técnicas genéticas já desenvolvidas e conhecidas. Muitos trabalhos já comprovaram a capacidade de linhagens vivas modificadas de *Salmonella* em induzir potente resposta imunológica, celular e humoral. No entanto, esta resposta é diferente para cada espécie de hospedeiro.

O processo de respiração anaeróbica é determinado por uma série de genes que visam proporcionar melhor aproveitamento das fontes de energia disponível. Várias enzimas podem ser produzidas, conforme o substrato disponível. Diante das considerações acima, o presente projeto foi proposto para analisar a importância de genes envolvidos na produção de enzimas que atuam no mecanismo de respiração anaeróbica de STM no que diz respeito à sobrevivência da bactéria em condições de anaerobiose como ocorre dentro da célula hospedeira.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Salmoneloses Aviárias

O gênero *Salmonella* é composto de bactérias morfológica e bioquimicamente homogêneas, são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos e anaeróbicos facultativos. Pertencem à família *Enterobacteriaceae*, possuem capacidade para metabolizar nutrientes, catabolizando D-glicose ou outros carboidratos, com exceção de lactose e sacarose, com produção de ácido e gás (LE MINOR *et al.*, 1992; BERCHIERI *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2000). São catalase positiva e oxidase negativa, como todos os membros desta família. Não fermentam malonato, não hidrolisam uréia, não produzem indol, utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito e produzem ácido sulfídrico (DICKEL, 2004).

Com base em características fenotípicas e genotípicas, o gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (LE MINOR *et al.*, 1987; REEVES *et al.*, 1989; POPOFF *et al.*, 1996; FIERER *et al.*, 2001). Esta última se divide em seis subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *houtenae*. As salmonelas de maior importância médica pertencem às subespécies *enterica* e *arizonae*. A designação de *Salmonella* Typhimurium passou a ser *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium, ou de forma simplificada *Salmonella* Typhimurium (LE MINOR *et al.*, 1992; POPOFF *et al.*, 1996; EUZEBY, 1999; BRENNER *et al.*, 2000).

O gênero *Salmonella* compreende mais de 2.500 sorotipos distribuídos amplamente na natureza. Podem infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo o homem, animais silvestres e domésticos. Informações sobre a incidência e distribuição dos sorotipos de salmonelas na população de

animais domésticos são essenciais para conhecer os possíveis reservatórios que possam ser responsáveis pela infecção de seres humanos (GAST, 1997).

As aves têm sido consideradas o veículo mais comum de salmoneloses humanas (TAUXE, 1991; KAISER *et al.*, 2000; HUGHES *et al.*, 2008). Estas bactérias infectam as aves e podem causar três enfermidades distintas: a Pulorose, cujo agente é a *Salmonella Pullorum* (SP), o Tifo Aviário, causado pela *Salmonella Gallinarum* (SG), e o Paratifo Aviário, causado por qualquer outra salmonela que não seja *Salmonella Pullorum* ou *Salmonella Gallinarum* (BERCHIERI, 2000). Em função da associação de enfermidade alimentar em humanos (DTA), com produtos de origem avícola, os programas de monitoramento e controle de salmonelas paratíficas em aves tem merecido atenção especial (BRASIL- PROGRAMA NACIONAL DE SANIDADE AVICOLA - PNSA-, 2003).

A Pulorose é uma enfermidade que pode acometer aves em qualquer idade, mas é comum em aves jovens, nas três primeiras semanas de vida. O Tifo Aviário, embora seja causado por uma *Salmonella* muito semelhante ao agente da Pulorose, apresenta uma relação parasita-hospedeiro com a ave bastante diferente. A SG é altamente patogênica para aves em qualquer idade. No entanto, a sua ocorrência é mais comum entre aves adultas. O Paratifo Aviário, não tem um agente específico. Muitos sorotipos de *Salmonella* já foram isolados de aves com ou sem o quadro da enfermidade (BERCHIERI, 2000). Os mais comuns são a *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (FERRIS *et al.*, 2003; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2004).

Quanto ao Paratifo Aviário, a infecção pode ocorrer por transmissão vertical ou horizontal (LISTER, 1988; VAN IMMENSEEL *et al.*, 2004), podendo se manifestar em qualquer estágio do ciclo de produção (BYRD *et al.*, 1999; BAILEY *et al.*, 2002). As aves jovens são mais susceptíveis e quando a enfermidade se desenvolve, o quadro é passível de confusão com a Pulorose (BERCHIERI, 2000). A capacidade das cepas de *Salmonella enterica* de produzir doença em aves está relacionada ao sorotipo e a cepa de *Salmonella*, idade e características genéticas da ave. A infecção por STM resulta em

rápida disseminação entre as aves e intensa contaminação do ambiente (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2005).

Quanto à patogenicidade, o gênero *Salmonella* pode ser dividido em dois grupos. Um grupo normalmente produz doença sistêmica e, raramente, está envolvido em infecção alimentar (BARROW, 2007). Os sorotipos hospedeiros-específicos podem causar doença sistêmica com envolvimento de monócitos e macrófagos e, em geral, pouca colonização intestinal. Neste grupo encontram-se SP e SG. O outro grupo, no qual faz parte a maioria das sorovares, normalmente produz infecção alimentar e só ocasionam doença sistêmica sob circunstâncias particulares, em animais muito jovens ou velhos e após algumas infecções de origem viral (BARROW *et al.*, 1997; UZZAU *et al.*, 2000).

A infecção da ave por *Salmonella* pode ocasionar bacteremia e gastroenterite (GOLDBERG & RUBIN, 1988). Após a ingestão oral, *Salmonella* penetra no epitélio da mucosa do intestino interagindo com as células colunares epiteliais (CARTER & COLLINS, 1974). A interação entre *Salmonella* e o epitélio desencadeia a quimiotaxia das células fagocitárias até o sítio da infecção (RUITENBERT *et al.*, 1971). Esta resposta celular envolve tanto neutrófilos como macrófagos, que migram para a superfície luminal onde inicia-se o processo de eliminação do patógeno (OZAWA *et al.*, 1973).

A penetração e a invasão das microvilosidades levam à proliferação de macrófagos residentes nos folículos linfóides (KRAEHENBUHL *et al.*, 1992). As salmonelas são capazes de sobreviver e se reproduzir dentro dos macrófagos, como os de ratos e de galinhas (FIELDS *et al.*, 1986; LEUNG *et al.*, 1991; ABSHIRE *et al.*, 1993; STABLER *et al.*, 1994; ALPUCHE-ARANDA *et al.*, 1995). A classificação do agente como sendo um parasita intracelular facultativo foi inicialmente proposta por Surter (1956), descrevendo-o como um organismo capaz de sobreviver e se multiplicar dentro de fagócitos presentes no espaço extracelular, durante alguns estágios da interação parasita-hospedeiro (SUTER & RAMSEIER, 1964).

Os macrófagos desempenham um papel importante na disseminação de *Salmonella* em órgãos do sistema reticuloendotelial, como linfonodos mesentéricos, fígado e baço (CARTER & COLLINS, 1974). A sobrevivência dentro dos macrófagos é essencial para a plena expressão da virulência da *Salmonella* em ratos e coelhos, estudados como modelos mamíferos. A literatura descrevendo a patogênese de *Salmonella* em aves é limitada. Os heterófilos das aves são considerados homólogos aos neutrófilos de mamíferos na sua ação como fagócitos e sua importância na defesa contra as infecções bacterianas (BRUNE *et al.*, 1972; TOPP *et al.*, 1972; POWELL, 1987). A capacidade bactericida de heterófilos e macrófagos para eliminar *Salmonella* foi relatada por meio de ensaios realizados *in vitro* (STABLER *et al.*, 1994).

Quando as salmonelas paratíficas provocam enfermidade em aves, são observados sinais clínicos, tais como: anorexia, depressão, perda de peso, penas eriçadas, sonolência, alterações oculares e nervosas (BARROW, 2000). Jacob *et al.* (1998), encontrou lesões oculares (panoflalmia purulenta com hiperplasia da córnea) em aves infectadas com *Salmonella* Typhimurium. A contaminação dos ovos pode provocar mortalidade embrionária e morte rápida em aves recém nascidas, sem a manifestação de outros sinais. Os sinais clínicos são raramente observados em aves com mais de 14 dias de idade. No entanto, poderá ocorrer mortalidade e haverá retardo no crescimento (BERCHIERI, 2000).

Em animais jovens observa-se gastroenterite (TURNER *et al.*, 1998). Os sintomas de enterite podem estar presentes, observando-se acumulações de matéria fecal ao redor da cloaca. Em aves adultas este sintoma pode ou não acontecer; na maioria das vezes estas aves atuam como reservatórios da bactéria sem apresentar sintomatologia (HENDERSON *et al.*, 1999). A morte ocorre geralmente 10 dias após a infecção e decorre, provavelmente, da combinação entre diarreia, anorexia e desidratação (BARROW *et al.*, 1987). As aves convalescentes poderão eliminar a bactéria por várias semanas (BARROW, 2000).

De um modo geral, as salmonelas que não tem hospedeiro específico (salmonelas aviárias paratíficas) são capazes de estabelecer uma infecção

subclínica nos animais e torná-los potenciais fontes de infecção alimentar para seres humanos. Os dados existentes indicam que a prevalência de salmonelose animal é variável e está correlacionada com a espécie animal, tipo de criação e região de produção, estando esta variação entre 0% e 90% (suínos, bovinos e aves) (SMITH, 1994; CHRISTENSEN *et al.*, 2002; COOK & MILLER, 2005).

2.2- Metabolismo bacteriano

Os patógenos bacterianos requerem a expressão coordenada de seus genes para conseguir superar os sistemas de defesa do hospedeiro. Essa expressão se inicia quando a *Salmonella* entra em contato com o meio ambiente hostil, como o trato gastrointestinal do hospedeiro. As condições adversas do meio atuam como sinais para que comece a transcrição de genes que codificam os fatores de virulência, que auxiliarão na interação com a célula alvo (TAKEUCHI *et al.*, 1965; KOHBATA *et al.*, 1986; POSPISCHIL *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 1992; FIGUEROA & VERDUGO, 2005). Assim, quando STM atinge o trato gastrointestinal, tem que se adaptar a um ambiente anaeróbico, para realizar atividades metabólicas essenciais (ERNST *et al.*, 1990).

Uma das características da célula bacteriana é a sua rápida capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais em que se desenvolve. Esta estratégia é adotada para produzir energia a partir do substrato disponível. Portanto, a regulação da expressão gênica constitui-se em uma ferramenta fundamental para adaptação e sobrevivência no *habitat* em que a bactéria se encontra (ERNST *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 1990; SCHIEMANN *et al.*, 1991; BEHLAU & MILLER, 1993; TARTERA *et al.*, 1993).

O metabolismo bioquímico bacteriano se ajusta em função de variações das características físico-químicas do meio exterior, relacionadas com aspectos nutricionais (presença ou ausência de íons, fontes de energia) e parâmetros físicos (temperatura, pressão hidrostática ou a pressão osmótica) (GALAN *et al.*, 1990; FIGUEROA & VERDUGO, 2005). Durante a infecção sistêmica é

mínima a disponibilidade de oxigênio, forçando a bactéria a desenvolver respostas adaptativas (LEE *et al.*, 1990).

O termo metabolismo refere-se ao conjunto das reações bioquímicas que ocorrem em uma célula ou organismo. O metabolismo apresenta sistemas integrados, compostos por enzimas que mediam reações que requerem energia. Geralmente, este processo produz a remoção, transferência, adição de um átomo ou grupo funcional (LENHINGER, 2006). Este processo tem três funções específicas (FELL, 1997).

- ❖ Obter energia química do meio e conservá-la para utilização em diferentes funções celulares.
- ❖ Converter os nutrientes exógenos em unidades precursoras de componentes macromoleculares de células bacterianas.
- ❖ Formar e degradar moléculas necessárias para diferentes funções celulares específicas.

O metabolismo é um fenômeno vinculado à aquisição e uso eficiente de energia. Os organismos que usam energia com maior eficiência têm mais chance de sobreviver e reproduzir seus genes, passando à sua descendência, as características vantajosas que possuem. Com base nesta propriedade, as enzimas obedecem a rotas pré-programadas; as vias biossintéticas (anabolismo) e as vias catabólicas (catabolismo) (JURTSHUK, 1999).

O anabolismo é o conjunto de todas as reações de síntese de compostos orgânicos estruturais (proteínas da membrana plasmática, glicoproteínas) e funcionais (enzimas) de uma célula, ou seja, a síntese de moléculas complexas a partir de moléculas simples. As reações anabólicas são importantes para o crescimento, construção e reparo de estruturas celulares (JURTSHUK, 1999). Estas reações requerem um fornecimento de energia, geralmente na forma potencial de transferência do grupo fosforilado (ATP) e moléculas com poder redutor (NADH, NADPH ou FADH₂) (BRANDT, 1997).

O catabolismo é o conjunto de todas as reações de degradação de compostos orgânicos (carboidratos, gorduras, proteínas) destinados à

obtenção de energia (BROCK *et al.*, 1988). As reações catabólicas liberam energia pela quebra de moléculas complexas em moléculas mais simples (por exemplo ácido láctico, CO₂ e NH₃), uma parte da qual é conservada na forma de ATP e de transportadores de elétrons reduzidos (NADH, NADPH e FADH₂). O catabolismo fornece a energia requerida para os processos vitais, como movimento e transporte, entre outros (LENHINGER, 2006).

Os anaeróbios facultativos, assim como *E. coli* e STM podem crescer em condições aeróbicas ou anaeróbicas, produzindo energia por processos respiratórios ou fermentativos. Aerobicamente, o oxigênio serve como acceptor terminal. Anaerobicamente, a alternativa de acceptor de elétrons pode ser oferecida por nitrato, fumarato, dimetil sulfóxido (DMSO) e N-óxido de trimetilamina (TMAO) (LIN & KURITZKES, 1987; POOLE & INGLEDEW, 1987; CONTRERAS *et al.*, 1997; UNDEN *et al.*, 1997). Estes sistemas regulatórios específicos garantem a utilização do processo metabólico energeticamente mais favorável (SPIRO & GUEST, 1991; STEWART, 1993; GUEST, 1995).

Componentes da cadeia de transporte de elétron, usando oxigênio como elétron acceptor, são necessários para o crescimento da bactéria na fase estacionária e para virulência (BARROW *et al.*, 1996; ZHANG-BARBER *et al.*, 1997). No entanto, foi observado que mutantes de STM, contendo alterações em genes que expressam componentes dessa cadeia (*nuo*, *cyd*, *cyo*) em adição da ATP sintase (Adenosine Triphosphate) colonizaram o trato digestivo tão eficientemente como a cepa original. Diante dessas circunstâncias, postula-se que o metabolismo energético possa ser fermentativo ou que a respiração utiliza uma via alternativa de aceptores de elétrons.

2.3- Respiração bacteriana

A respiração é um processo de geração de energia (ALBERTS *et al.*, 1994). As substâncias com alto valor energético são sempre aquelas com melhores taxas de redução (JURTSHUK, 1999). Quando o oxigênio atua como receptor final de elétrons, o processo é chamado respiração aeróbica. Se o acceptor final de elétrons for uma substância inorgânica diferente do

oxigênio, como os íons nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}) e carbonato (CO_3^{2-}) se denomina respiração anaeróbica. Se o acceptor final for um composto orgânico, o processo é denominado fermentação (LENHINGER, 2006).

2.3.1- Anaerobiose

A *Salmonella Typhimurium* é um parasita intracelular facultativo com a capacidade de penetrar, sobreviver e se multiplicar em diversos tipos de células eucariotas, incluindo células epiteliais e fagócitos (DIRITA & MEKALANOS, 1989; FINLAY & FALKOW, 1989; GROISMAN & SAIER, 1990; LEUNG, 1991; ALPUCHE-ARANDA *et al.*, 1992; FALKOW *et al.*, 1992; FINK *et al.*, 2007). Durante a fase de infecção, o ambiente de anaerobiose é um importante sinal de ativação, adesão, crescimento e sobrevivência intracelular da STM (ERNST, 1990; FINK *et al.*, 2007). Os organismos que crescem com limitações de oxigênio têm maior poder invasivo que aqueles que crescem em condições aeróbicas (LEE *et al.*, 1990; FINK *et al.*, 2007).

Os conhecimentos adquiridos da biologia celular estão baseados exclusivamente em modelos *in vitro*, com poucos conhecimentos sobre o crescimento celular da STM. Intracelularmente, a bactéria penetra e atravessa a membrana celular até chegar aos vacúolos onde inicia seu crescimento (GROISMAN & SAIER, 1990; MARTINEZ-MOYA *et al.*, 1998). Os nutrientes requeridos para o crescimento são em sua maioria, carboidratos fermentáveis e diversas formas de polissacarídeos (JONES *et al.*, 2007).

2.3.1.1- Componentes respiratórios

Existem três tipos de componentes respiratórios: substrato (doador de elétrons), quinonas e oxidoredutases terminais (acceptor de elétrons). As quantidades desses componentes são reguladas no processo respiratório em concordância com os substratos apresentados e as necessidades fisiológicas da célula (GENNIS & STEWART, 1996).

- Doadores de elétrons

Formiato

Formiato (HCO_2^-) é um produto da clivagem do piruvato em anaerobiose. *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* metabolizam piruvato por meio de dois mecanismos distintos. Na ausência de aceptores de elétrons exógenos, o formiato é convertido em dióxido de carbono e dihidrogênio pela enzima formiato-piruvato liase. Na presença de acceptor de elétron exógeno a oxidação do formiato para dióxido de carbono é acoplada à redução do acceptor, formando a cadeia respiratória anaeróbica (GENNIS & STEWART, 1996). A expressão da formiato desidrogenase é induzida durante o crescimento anaeróbico com nitrato (LESTER *et al.*, 1971), mas não é estimulada por outros aceptores de elétrons como nitrito e TMAO (BERG *et al.*, 1990).

Glicose

A enzima responsável pela redução da glicose é uma quinona chamada D-Glicose Desidrogenase (D-Glicose: Enzima Gcd Quinona Oxidorredutase). O sitio de atividade desta enzima fica no periplasma. A enzima oxida glicose a gluconato e reduz ubiquinona (WISSENBACH, *et al.*, 1992).

Glicerol 3-Fosfato

E. coli e STM expressam duas desidrogenases glicerol 3- fosfato respiratórias. As duas enzimas oxidam glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato e reduzem quinona na membrana citoplasmática. A função é conservar o glicerol e o glicerol fosfato gerados pela decomposição dos fosfolípidios e triacilglicerol. A oxidação do glicerol junto com a redução de um acceptor de elétrons é um processo obrigatório na procura de fonte de carbono (IUCHI *et al.*, 1990).

Hidrogênio

E. coli e STM podem utilizar hidrogênio como doador de elétrons na respiração anaeróbica, utilizando como aceptores de elétrons: nitrato, DMSO, TMAO, e fumarato (MACY *et al.*, 1976; SAWERS *et al.*, 1986; BERG *et al.*, 1990; WISSENBACH *et al.*, 1990).

NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina)

Em seres eucarióticos, o NADH é o doador de elétrons mais importante. Em organismos procarióticos a situação é diferente, devido ao maior número de doadores e aceptores de elétrons que dispõem. As bactérias podem utilizar diversas cadeias de transporte de elétrons onde algumas são utilizadas simultaneamente (SLED *et al.*, 1993; GENNIS & STEWART, 1996).

- Quinonas

As quinonas são moléculas solúveis em lipídios podendo, portanto, se dissolver no interior da bicamada lipídica da membrana plasmática. São mediadoras da transferência de elétrons entre componentes protéicos da cadeia respiratória. *E. coli* sintetiza três tipos de quinonas: benzoquinona, ubiquinona (Q) e duas naftoquinonas [menaquinona (MK) e demetilmenaquinona (DMK)] (GENNIS & STEWART, 1996; TIELENS *et al.*, 1998).

- Aceptores de elétrons

E. coli e STM podem ter respiração aeróbica ou anaeróbica utilizando aceptores de elétrons alternativos (O₂, NO₃, TMAO, DMSO e Fumarato) (BARRETT *et al.*, 1982, 1984, 1985; HEINZINGER *et al.*, 1995; WEI *et al.*, 1999; RAVCHEEV *et al.*, 2007). Dependendo da disponibilidade desses substratos, a célula sintetiza uma ou mais das enzimas terminais da via de transporte de elétrons (TSENG *et al.*, 1994). Para o processo infeccioso, STM deve ser capaz de se adaptar às condições do ambiente variável que o hospedeiro oferece. Está comprovado que as bactérias se adaptam ao ambiente mediante a regulação da expressão genética (ERNST, 1990; JONES *et al.*, 1994; CONTRERAS *et al.*, 1997).

As bactérias selecionarão entre os aceptores de elétrons disponíveis, aqueles com maior aptidão energética (ATLAS & BARTHA, 1993). Entretanto,

em anaerobiose, nenhum dos aceptores de elétrons disponíveis apresentará o potencial energético do oxigênio, o que significa que a respiração anaeróbica será sempre menos eficiente, conduzindo a taxas de crescimento mais lentas que nos organismos aeróbicos (LENHINGER, 2006).

De acordo com Taylor *et al.*, (1979), os aceptores alternativos de elétrons mais utilizados são nitrato e fumarato.

Nitrato

A respiração bacteriana utilizando o nitrato como aceptor de elétrons tem sido muito estudada em enterobactérias (STEWART, 1988). Salmonelas são capazes de utilizar nitrato para respirar, sendo a redução anaeróbica do nitrato, a via respiratória mais importante para esses microorganismos (PAYNE, 1973; NEUBAUER *et al.*, 1996). Durante a respiração em anaerobiose, o nitrato parece ser uma das mais favoráveis fontes de energia como aceptor de elétrons, porque sua presença inibe a síntese de enzimas envolvidas na utilização de outros substratos (GENNIS & STEWART, 1996; UNDEN *et al.*, 1997). Neste processo o formiato pode ser o maior doador de elétrons (STOUTHAMER, 1969; BARRETT *et al.*, 1982).

A respiração anaeróbica em *E. coli* está acoplada a uma cadeia transportadora de elétrons presente na membrana, onde a molibdênio enzima Nitrato Redutase A (NRA) catalisa a redução do nitrato a nitrito (NO_2^-) (HADDOCK & JONES *et al.*, 1977; STEWART, 1988; WOOTTON *et al.*, 1991; HARTIG *et al.*, 1999; PHILIPPOT *et al.*, 2001). Esta é uma das várias vias de óxido-redução induzíveis que a *E. coli* possui (INGLEDEW & POOLE 1984; STEWART, 1993) com grande similaridade às identificadas em bactérias desnitrificantes (BERKS *et al.*, 1995).

A maioria das bactérias consegue utilizar a amônia como fonte de nitrogênio, enquanto outras podem usar os nitratos. A redução de nitratos pode se realizar por dois mecanismos diferentes: redução assimiladora (na qual é reduzido pela via do nitrito) e redução desassimiladora (na qual o nitrato

serve como aceptor final de elétrons) (MORENO-VIVIAN *et al.*, 1999). A primeira está bastante difundida entre a maioria das bactérias, a segunda só é comum em bactérias anaeróbicas e anaeróbicas facultativas (LI *et al.*, 1994).

Várias são as enzimas envolvidas no processo de redução de nitrato. Existem quatro tipos de nitrato redutases que catalisam a redução do nitrato a nitrito: uma nitrato redutase assimilatória presente em eucariotas e três nitrato redutases bacterianas distintas que são: a assimilatória citoplasmática (Nas), a respiratória ligada a membrana (Nar) e a dessasimilatória periplasmática (Nap) (MORENO-VIVIAN *et al.*, 1999; PHILIPPOT, 2002).

A mais importante é a nitrato redutase (*narGHJ*), cuja síntese é induzida pela presença de nitrato, durante a fase de crescimento em anaerobiose. Esta é composta por três subunidades: subunidade que transfere elétrons (γ), a di-hem desidrogenase de quinona de membrana integral (β) e a subunidade catalítica molibdopterina (α) (CHÉNEBY *et al.*, 2003). O gene *narG* presente em STM codifica a subunidade α catalítica (PHILIPPOT *et al.*, 2001). Salmonelas não conseguem assimilar nitratos pela via respiratória em aerobiose. A combinação da respiração utilizando as enzimas nitrato redutase e NADH-nitrito redutase permite que enterobactérias cresçam anaerobicamente utilizando nitrato como única fonte de nitrogênio (BLASCO *et al.*, 1990).

O radical altamente reativo óxido nítrico (NO) é encontrado na bactéria e pode ser produzido endogenamente como intermediário durante a redução de nitrito ao óxido nitroso (N₂O), como produto da redução respiratória de nitrito à amônia ou gerado em sistemas biológicos pela via de atividade da NO sintetases e, nitrato e nitrito redutases. NO também atua como uma molécula produzida pelos macrófagos fazendo parte da resposta imune inata (DIETERT & GOLEMBOSKI, 1998; WEINBERG, 1999). Está demonstrado que a produção da induzível nitrito óxido sintetase (iNOS) e a fagócito oxidase (Phox) são importantes para a morte bacteriana (SHILOH *et al.*, 1999; VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2000ab; MASTROENI & SHEPPARD, 2004.). Os macrófagos têm um papel central como defensas do hospedeiro na infecção e também na regulação da resposta imune e inflamação (FIELDS *et al.*, 1986; BJUR *et al.*,

2006). A ativação dos macrófagos na supressão do crescimento bacteriano nas células do hospedeiro é um mecanismo essencial de defesa contra patógenos intracelulares (UCHIYA *et al.*, 2005). Muitas bactérias não resistem às ações do NO, entre elas a *Salmonella*, e só podem sobreviver eventualmente se replicando dentro dos macrófagos (VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2001).

A *Salmonella* Typhimurium durante o crescimento anaeróbico com nitrato tem a capacidade de reduzir nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (GILBERTHORPE & POOLE, 2008). As enterobactérias possuem mecanismos de inibição do óxido nítrico, dentre os quais esta a flavohemoglobina (Hmp) (CRAWFORD & GOLDBERG, 1998; GILBERTHORPE *et al.*, 2007) e a flavorubredoxina (NorV) (MILLS *et al.*, 2005). A flavohemoglobina e a flavorubredoxina transformam o óxido nítrico a NO_3^- ou N_2O respectivamente (POOLE, 2005).

Outra enzima (*narZYV*), homóloga a esta, é produzida em baixa concentração. *Salmonella* Typhimurium LT2 contém pelo menos duas enzimas nitrato redutases. São as enzimas *narZYV* e *napABC*, mas nenhuma foi devidamente caracterizada (BARRETT & RIGGS, 1982). Acredita-se que a atividade da enzima *narZYV*, em baixa quantidade, tem um papel também proposto para o sistema *nap*, na adaptação para o metabolismo anaeróbico durante a transição entre ambiente em aerobiose para anaerobiose, uma vez que esta enzima não é regulada pelo oxigênio ou por nitrato. Seria, portanto, o início da manifestação da respiração anaeróbica na ausência de oxigênio (SIDDIQUI *et al.*, 1993).

A enzima respiratória localizada no periplasma é a periplasma nitrato redutase (*napABC*). Sua função fisiológica ainda carece de mais esclarecimentos, embora acredita-se que sua ação consiste na redução de excessos equivalentes, mantendo um balanço redox otimizado (RICHARDSON *et al.*, 1988; BERKS *et al.*, 1995).

Fumarato

E. coli e STM podem utilizar fumarato como acceptor final de elétrons na respiração anaeróbica (WESTENBERG *et al.*, 1993). A enzima responsável pela redução do fumarato é a fumarato redutase. Esta enzima contém quatro subunidades catalíticas (*frdABCD*). A *frdA* e *frdB* são proteínas extrínsecas da membrana. A *frdC* e *frdD* são proteínas intrínsecas da membrana. As quatro subunidades são necessárias para que a bactéria possa respirar em anaerobiose, utilizando fumarato (CECCHINI *et al.*, 1986; COLE *et al.*, 1985).

A enzima fumarato redutase é codificada pelo operon *frdABCD*. A síntese enzimática requer condições de crescimento em anaerobiose, não é induzida apenas por fumarato e é inibida pela presença de nitrato. STM é capaz de utilizar fumarato como acceptor terminal de elétrons durante a respiração em anaerobiose (JONES, 1985, 1987).

A fumarato redutase pode ser semelhante à succinato deshidrogenase sobre muitos aspectos, exceto em que possivelmente catalisa a reação reversa, reduzindo fumarato a succinato. Esse passo é parte do ciclo do ácido tricarbóxico que opera em células com respiração aeróbica (VAN HELLEMOND & TIELSEN, 1994).

Sulfato

Salmonella Typhimurium pode utilizar hidrogênio como doador de elétrons para a respiração anaeróbica com nitrato, DMSO, TMAO e fumarato como aceptores de elétrons (SAWERS *et al.*, 1986). *E. coli* pode usar vários compostos óxidos -S e -N como aceptores de elétrons durante o processo de respiração em anaerobiose, incluindo DMSO, TMAO e adenosine N-óxido.

Duas molibidênio enzimas estão envolvidas nesse processo. Uma ligada à membrana, denominada DMSO redutase (*dmsABC*) e outra induzível denominada TMAO redutase (*torACD*) (KWAN & BARRETT, 1983).

São sintetizadas quatro TMAO redutases distintas. Três induzíveis e uma continuamente expressada. As três induzíveis correspondem a diferentes formas associadas da mesma enzima (*torACD*) e a forma constitutiva corresponde a enzima *dmsABC* (BILOUS & WEINER, 1988). Tanto *tor* quanto *dms* podem individualmente suportar a respiração com TMAO, *pyridine N-oxide* e *picoline N-oxide*, enquanto a enzima *dmsABC* é necessária, especificamente para a respiração com DMSO ou *methionine sulfoxide*, sugerindo que a enzima *torACD* não participa da respiração com DMSO (DARUWALA & MEGANATHAN, 1991), embora a enzima *torACD* seja expressa igualmente por DMSO ou TMAO (SILVESTRO *et al.*, 1988). Mutantes contendo os genes *dms* e *tor* defectivos mantêm a habilidade de respirar com adenosine N-óxido, mas não conseguem respirar com outros produtos (SAMBASIVARAO & WEINER, 1991).

A nitrato redutase e DMSO redutase catalisam o transporte de prótons trans- membrana. A enzima *dms* contém três subunidades. Uma subunidade maior (*dmsA*) formada por uma molibidênio-proteína contendo a atividade catalítica. Uma menor (*dmsB*) contendo ferro-enxofre e uma intrínseca na membrana (*dmsC*). A enzima *dmsA* está presente na face externa da membrana, voltada para o citoplasma. Todas as subunidades são importantes para a atividade enzimática (SAMBASIVARAO & WEINER, 1991).

Acido cobirínico

Evolutivamente a cobalamina (vitamina B₁₂) é um cofator e uma das moléculas estruturalmente mais complexas (GEORGOPAPADAKOU *et al.*, 1977; ESCHENMOSER, 1988; BENNER *et al.*, 1989; WARREN *et al.*, 2002; ESCALANTE-SEMERENA, 2007). Esta vitamina é um nutriente essencial para muitos animais e só é adquirida pela sua ingestão. Em geral, considera-se que as plantas não sintetizam cobalamina, sendo as bactérias os principais produtores desta vitamina (ESCALANTE-SEMERENA *et al.*, 1992; BRINDLEY *et al.*, 2003; ZAYAS & ESCALANTE-SEMERENA, 2007). Sua síntese ocorre

em condições de anaerobiose, podendo ser sintetizada tanto em aerobiose como anaerobiose quando a bactéria for suprida com as substâncias precursoras como *cobinamide* (JETER *et al.*, 1984; ESCALANTE-SEMERENA, 1990; 2007).

A cobalamina é uma família de compostos com uma estrutura determinada. A vitamina B₁₂ tem um peso molecular de 1,355kDa e resulta da união assimétrica de quatro anéis pirrólicos, formando um grupo macrocíclico quase planar (núcleo corrina) em torno de um átomo central de cobalto (FRESQUET *et al.*, 2004).

O operon responsável pela biossíntese da Coenzima B₁₂ (AdoCbl) contém 17 genes *cbiA-P*, que estão envolvidos na produção da porção inicial da molécula (anéis de corrina) e 3 genes envolvidos na integração do nucleotídeo à cobinamide (CobUST). Escalante *et al.* (1987), consideram que o papel mais importante da cobalamina é como promotor do catabolismo anaeróbico de fontes de carbono não fermentáveis.

Acido cobirínico a,c diamine sintetase de STM (*cbiA*) é a primeira amino-transferase na via biossintética anaeróbia da vitamina B₁₂ e sua atividade catalisadora é dependente de ATP. Esta via biossintética é um processo altamente complexo que precisa da atividade de mais de duas dezenas de enzimas diferentes, requer mais de 35 genes conhecidos, que compreende em torno de 1% do genoma bacteriano (ROTH *et al.*, 1993; RAUX *et al.*, 1996; MAGGIO-HALL *et al.*, 2004). A síntese endógena de B₁₂ é importante para o crescimento da *Salmonella*. Mutantes defectivos quanto à síntese de cobalamina apresentaram potencial de multiplicação deficiente sob condições experimentais (PRICE-CARTER *et al.*, 2001).

O penúltimo passo da via biossintética AdoCbl é catalisada pela enzima AdoCbl-5'-P (*cobS*), que é uma proteína de membrana (O'TOOLE *et al.*, 1993; MAGGIO-HALL *et al.*, 1999, 2004). Na *E. coli*, altos níveis desta enzima são detectados em resposta ao estresse de membrana, detectado pelo acúmulo da proteína PspA, que é codificada pelo operon *psp* (MAGGIO-HALL *et al.*, 2004).

Considera-se que altos níveis de PspA previnem a perda de prótons através da membrana (BRISSETTE *et al.*, 1990; KLEEREBEZEM *et al.*, 1996; MODEL *et al.*, 1997).

Conhece-se relativamente pouco sobre o metabolismo da cobalamina, a forma como é regulada sua síntese ou porque algumas bactérias produzem grande quantidade deste cofator (ESCALANTE-SEMERENA *et al.*, 1987). Quanto à sua função, é sabido que a cobalamina é um importante cofator de numerosas enzimas de metilação, redução e reordenamento intramolecular (SCHNEIDER *et al.*, 1987; STROINSKI, 1987). Apenas quatro enzimas dependentes de B₁₂ são identificadas em STM em condições anaeróbicas. Essas enzimas são: I. Homocisteína metil-transferase que catalisa o último passo da síntese de metionina, ela é requerida por uma de duas metiltransferases (produtos dos genes *metE* e *meth*) as quais independentemente podem catalisar a metilação da homocisteína para formar a metionina (ROTH *et al.*, 1993). II. Etanolamina amônia liase que degrada etanolamina a acetadeído e amônia. A *Salmonella* spp. utiliza etanolamina como fonte de carbono e nitrogênio (ROOF & ROTH, 1988, ROTH *et al.*, 1996). III. Propanediol-desidratase converte propanediol a propionaldeído. Foi recentemente mostrado que a *Salmonella* Typhimurium pode usar 1,2-propanediol como uma fonte de carbono sob condições anaeróbicas de crescimento somente se a vitamina B₁₂ é fornecida. IV. Quenosina sintetase que catalisa o último passo na síntese de quenosine (nucleosídeo modificado, encontrado em RNA^t_{Asp,Asn,His,Tyr}) (NOGUCHI *et al.*, 1982).

III. OBJETIVOS

Este trabalho foi elaborado para avaliar a infecção de aves por mutantes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, com o sistema respiratório anaeróbico comprometido, por alterações dos genes: *narG*, *napA*, *cobS*, *cbiA*, *frdA*, *dmsA*, e *torC*, verificando-se sinais clínicos e a mortalidade das aves causada pelas cepas modificadas em comparação com a cepa original de *Salmonella* Typhimurium.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Preparo de mutantes para estudo de genes envolvidos no processo de respiração anaeróbica.

4.1.1- Desenho dos *primers*

Foram preparados *primers* para os genes *cbiA*, *cobS*, *torC*, *dmsA*, *narG*, *napA* e *frdA*. Aos *primers* adicionou-se seqüências de nucleotídeos relativas aos sítios de restrição das enzimas necessárias para que os mesmos pudessem ser incorporados aos plasmídios e para a inserção de marcadores. Inseriu-se o gene de resistência à canamicina (Can^r) como marcador nos genes *cbiA*, *torC*, *narG* e o gene de resistência à espectinomicina (Spc^r) nos genes *napA*, *frdA*, *dmsA* e *cobS*.

Nos *primers* externos (1 e 4) adicionou-se a seqüência de bases para o corte pela enzima XbaI (tctaga) (Gibco 15226), enquanto que nos *primers* internos (2 e 3) adicionou-se a seqüência de bases para o corte pela enzima KpnI (ggtacc)(Gibco 15232) para canamicina (Can) e pela enzima BamHI (ggatcc) (Gibco 15201) para espectinomicina (Spc).

cobS:

Primer 4: agtctagaacagacccagcagaaagatc

Primer 3: ccgctaggtaccctgctgaccggtggtttca

Primer 2: cagcagggtacctagcggataccacaccagg

Primer 1: gagatctagaacgaatctgctgtttgcgct

cbiA:

Primer 4: tgtctagacagccagtgctgcaacattt

Primer 3: gccattggtaccatacggatgatgtaaaacat

Primer 2: ccgtaaggtaccaatggcattttgaggagct

Primer 1: catctagaaagcatcacgcatttattc

dmsA:

Primer 1: cgtctagaatgaaaactaagatccctga

Primer 2: aagatgggatcccatgaacggtgcaaagtgc

Primer 3: tcatgggatcccatcttcaaacagcgtgacc

Primer 4: actctagactgaacgagggtcgtatgtg

torC:

Primer 4: catctagattcattgtgttctcccttat

Primer 3: ggattgggtaccctgttctgaagtgaaagtc

Primer 2: aagcaggtaccaatccctttatggcagtcg

Primer 1: actctagaatgcgaaaactctggagagc

narG:

Primer 4: cgtctagatatgggtcggtttcggcgtaat

Primer 3: attggcgtaccttcttataacgccggta

Primer 2: aagaaaggtaccgccaatcagcgaaagata

Primer 1: cgtctagatgaactgcaccggttcttgta

Primer 5: taccattcaccgttgcttgtt

napA:

Primer 1: cgtctagaagctttatgaaagctaacgc

Primer 2: cagctcggatcctgtttagagcggaac

Primer 3: acaacaggatccgagctgggcttctatctg

Primer 4: gatctagacggcatcgaagaacggcatat

frdA:

Primer 1: cgtctagaaccttcaagccgatcttgc

Primer 2: cagttcggatcccatggtgtcatcaacca

Primer 3: accatgggatccgaactggtggtgttgggt

Primer 4: gctctagattcaccgccgtaaacacgttt

4.1.2- Procedimento experimental para preparo dos mutantes

A metodologia adotada seguiu os protocolos conforme Sambrook & Russel (2001) e Turner *et al.* (2003).

4.1.2.1- Preparo do gene defectivo

Para obtenção dos fragmentos 1+2 e 3+4 foi utilizada a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), tendo-se como substrato, cromossomo de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistente ao ácido nalidíxico

(STM Nal^r). O termociclador foi preparado com a seguinte programação: estágio 1: um ciclo de 95°C/1minuto; estágio 2: 95°C/20segundos, 50°C/1minuto e 72°C/1minuto, repetidos 25 vezes; estágio 3: um ciclo a 72°C/5minutos.

A solução submetida à PCR consistia de:

50 µL de X/mix [106 µL H₂O, 15 µL 10X buffer, 15 µL 2mM dNTP, 4,5 µL MgCl (Sigma p-7516)]

0,5 µL de *primer* 1 + 2

0,5 µL de *primer* 3 + 4

0,4 µL de taq DNA polimerase (Invitroyen 10342-020)

0,4 µL de cromossomo

Após a amplificação dos genes, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para análise do tamanho dos fragmentos obtidos (Aparelho: Consort E863, 600V 250mA, cuba Horizon 11-14 CE, Life Technology). Utilizou-se 90 mL de gel composto por agarose a 1%, diluída em solução tampão TAE (4,84g TRIS base, 1,034mL ácido acético glacial, 2mL 0,5M EDTA, H₂O qsp 1000mL, pH 8,0) acrescido de 9 µL de solução aquosa a 1% de Brometo de etídio (Sigma E-4391). As amostras, mais o marcador de peso molecular (1µL DNA Gibco 10787-018, 2µL de solução corante e 7µL água destilada) foram submetidos a uma corrente elétrica de 70V durante uma hora e meia. O gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado.

Após a constatação de que se obteve o produto desejado, as amostras foram purificadas em MicroSpin Columns S-400HR (Pharmacia Biotech). Posteriormente, os fragmentos 1+2 e 3+4 foram unificados através da técnica da PCR, utilizando a mesma solução e programação descritas acima, alterando-se apenas o tempo de extensão a 72°C, de 1 minuto para 1:30 minutos.

4.1.2.2. Inserção do gene no plasmídio p-Gem easy vector

Antes de o gene defectivo ser introduzido no mutante definitivo (STM NaI'), ele foi inserido em plasmídios, os quais, assim como as cepas de *E. coli* utilizadas para multiplicá-los, favorecem as transformações desejadas.

A primeira etapa consistiu da inserção do gene defectivo no plasmídio p-Gem easy vector (Promega L 2001), conforme recomendação do laboratório que o produz. Preparou-se uma mistura contendo p-Gem (0,5 µL), ligase *buffer* (2,5 µL), gene (1,5 µL) e ligase (0,5 µL), a qual foi incubada a 23°C/3horas. Em seguida, adicionou-se 2µL dessa mistura a 50µL de uma suspensão de células de *E. coli* cepa JM109 (JM109). Depois de permanecer 20 minutos em gelo, a suspensão de células foi submetida a 42°C durante 50 segundos, ficando em repouso por 2 minutos em gelo. Recebeu 950 µL do meio SOB (20,60g de triptona, 5g extrato de levedura, 0,6g de NaCl, 0,19g de KCl, H₂O qsp 1000mL, pH 8,0), sendo incubada a 37°C por 1:30/h. Decorrido este período, foi espalhada na superfície de cinco placas contendo ágar LB (ágar Lennox L 22700-025 Invitrogen) adicionado de solução de ampicilina (Amp) (100 µL/mL), de X-gal (200 µL diluído em DMSO Promega V 3941) e IPTG (0.04g/mL H₂O, Promega V3955). As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. As colônias de *E. coli* de coloração azul correspondem a aquelas que não receberam o plasmídio, enquanto que as colônias transformadas apresentam coloração branca.

Bactérias provenientes de colônias supostamente contendo o plasmídio p-Gem (brancas), foram submetidas à técnica da PCR, seguida de eletroforese, para confirmação.

A solução submetida à PCR consistia de:

30,0 µL de X/mix [106 µL H₂O, 15 µL 10X buffer, 15 MI 2mM dNTP, 4,5 µL MgCl (Sigma p-7516)]

0,5 µL de *primer* M13F

0,5 µL de *primer* 1

0,4 µL de taq DNA polimerase

Colônia (+)

A programação do termociclador foi mantida a mesma, utilizada na etapa de unificação dos fragmentos.

4.1.2.3. Extração do plasmídeo p-Gem easy vector de *E. coli* JM109

Uma colônia de *E. coli* JM109 com as características desejadas, confirmada por PCR, foi selecionada e inoculada em 10 mL de caldo LB, incubado a 37°C/24h em agitação. A cultura foi centrifugada a 4500rpm/4°C/12minutos. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE (10mM de TRIS pH 8,0, e 1mM de EDTA pH 8,0), transferido a um microtubo (1,5mL), no qual acrescentou-se 400 µL de SDS (0,45g de SDS, 3mL 3M de NaOH). Após misturar gentilmente, o tubo permaneceu em temperatura ambiente por 2 minutos. Prosseguindo, acrescentou-se 400 µL de KOAc (3M KC₂H₂O₂, 2M HOAc, 1mM EDTA) gelada e após misturar gentilmente, centrifugou-se por 4500rpm/4°C/5minutos. O sobrenadante foi transferido a outro tubo contendo 400 µL de fenol/clorofórmio (Sigma p-2069). Após nova centrifugação 4500rpm/4°C/5minutos, o sobrenadante foi transferido a outro microtubo, onde se adicionou 500 µL de isopropanol, centrifugando-se novamente por 10 minutos. A seguir, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se etanol (70%). Após a remoção do etanol, o sedimento foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE contendo 0,9 µL de RNAase (Sigma R-5500) e incubado a 37°C durante 30 minutos, sendo posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose.

4.1.2.4. Digestão enzimática

Nesta etapa, o produto (1+2 e 3+4) foi preparado para receber o marcador (gene de resistência a antibiótico). Os *primers* 2 e 3 foram desenhados contendo 6 bases relativas às enzimas BamHI (espectinomicina) ou KpnI (canamicina).

Componentes da solução enzimática:

Enzima	3 μ L
Tampão da enzima	4 μ L
Água destilada	23 μ L
DNA	5 μ L

A solução enzimática foi incubada a 37°C por 2 horas. A digestão foi interrompida adicionando-se 1 μ L de solução de EDTA pH 8, sendo em seguida, purificada em coluna (Qiagen purification kit) e submetida à eletroforese para avaliação.

4.1.2.5. Adição do gene que confere à bactéria resistência ao antibiótico e inserção no plasmídio p-Gem easy vector

Após a digestão enzimática, adicionou-se o marcador ao plasmídio p-Gem. Para tanto, 1,5 μ L do plasmídio mais 2,0 μ L do marcador (Can^r ou Spc^r), permaneceram 3 minutos a 55°C e em seguida, um minuto em gelo, antes de receber 1 μ L de ligase *buffer* e 0,5 μ L de ligase (Invitrogen 15224-025) e ser incubado a 23°C por 3 horas. Posteriormente, adicionou-se 2 μ L dessa mistura a 50 μ L de uma suspensão de células de *E. coli* JM109 que permaneceu 20 minutos em gelo, sendo a seguir submetida à temperatura de 42°C por 50 segundos, voltando a permanecer em gelo por 2 minutos. Após receber 950 μ L do caldo SOB, foi incubada a 37°C por uma hora, sendo em seguida despejada em 6 placas de ágar LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) mais canamicina (30 μ g/mL) ou espectinomicina (50 μ g/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Colônias bacterianas resistentes à ampicilina (Amp^r) e canamicina (Can^r) ou Amp^r e espectinomicina (Spc^r), foram submetidas à técnica da PCR, para confirmação.

As cepas de STM Amp^r e Can^r foram submetidas à técnica da PCR utilizando-se os *primers* M13F + 19077, M13F + 19078, M13R + 19077 e M13R + 19078. Para os mutantes Amp^r e Spc^r, utilizaram-se os *primers* M13F + M13R e Spc IN. Os *primers* 19077 e 19078 identificam o marcador Can^r e o *primer* Spc IN, o marcador Spc^r.

4.1.2.6. Extração do plasmídio p-Gem easy vector de *E. coli* JM109 e digestão enzimática

O plasmídio p-Gem foi novamente extraído de células de *E. coli* JM109 para nova digestão enzimática à semelhança do que foi feito anteriormente (4.1.2.3), exceto que agora, tratou-se com a enzima XbaI (utilizando-se o tampão 2) todos os genes. Esta enzima atua na extremidade dos *primers* 1 e 4 no plasmídio, permitindo a separação do gene defectivo do p-Gem e posterior ligação no plasmídio pJCB12, também submetido à digestão por XbaI.

A solução obtida foi submetida à eletroforese em gel de agarose para confirmar a ação enzimática.

Na etapa seguinte transferiu-se o gene defectivo para outro plasmídio (pJCB12).

4.1.2.7. Ligação do gene defectivo no plasmídio JCB12

Para a inserção do gene defectivo no plasmídio, misturou-se 2,5 µL da solução contendo p-Gem, após digestão enzimática, com 1,0 µL de pJCB12, também submetido ao mesmo processo de digestão enzimática. Após tratamento térmico a 55°C por 3 minutos, a mistura permaneceu em gelo por 1 minuto e adicionou-se 1,0 µL de ligase *buffer* e mais 0,5 µL de ligase. Após homogeneização, a mistura foi incubada a 23°C/2horas, permanecendo a -20°C até o momento de uso.

- Preparo de células de *Escherichia coli* DH5αλ pir

Esta cepa de *E.coli* (DH5αλ pir) é necessária por favorecer a multiplicação do pJCB12.

Preparou-se uma cultura de *E. coli* DH5αλ pir em caldo LB (Invitrogen 12780-052) incubado a 37°C/24h. Desta cultura, transferiu-se 1 mL para 100mL de caldo LB incubado a 37°C/3horas em agitação. A cultura foi centrifugada a 4000rpm/4°C/14 minutos e o sedimento obtido, foi ressuspenso em 50 mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 3500rpm/4°C durante 14 minutos. O sedimento final foi ressuspenso em 80 µL de solução de glicerol a 10% e mantido em gelo.

- Eletro-transformação

A suspensão de células de *E.coli* DH5αλ pir (80 µL) foi misturada com 4 µL da solução de plasmídios, permaneceu 1 minuto em gelo e foi transferida para uma cuba (0,1 mL) de eletro-transformação, a qual, foi submetida a uma corrente elétrica (aparelho gene pulse Biorad, resistência 200 OHMS, capacitância 25 uFD e gene pulse 125). Em seguida, acrescentou-se um mL de caldo LB e incubou-se a suspensão bacteriana a 37°C/1hora. Depois, espalhou-se a cultura sobre placas de ágar LB acrescido de cloranfenicol (20µg/mL) e canamicina (30µg/mL) ou espectinomicina (50µg/mL), que foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Assim como a ampicilina era o marcador de p-Gem, cloranfenicol é o marcador do pJCB12.

Colônias bacterianas resistentes a cloranfenicol (C^r), Spc^r ou Can^r e Amp^s, foram purificadas e submetidas à PCR e eletroforese em gel de agarose para confirmação. São colônias de *E. coli* DH5αλ pir contendo pJCB12 (C^r) com o gene (Can^r ou Spc^r), mas que não contêm mais o p-Gem (Amp^s).

A solução submetida à PCR consistia de: 30 µL de X/mix [106 µL H₂O, 15 µL 10X buffer, 15 µL 2mM dNTP, 4,5 µL MgCl (Sigma p-7516)].

0,5 µL de *primer 1*

0,5 µL de *primer 4*

0,4 µL de Taq DNA polimerase

Colônia (+)

4.1.2.8. Transferência de p-JCB12 (C^r e Can^r ou Spc^r) para *E. coli* S17.1 λ pir

Após a confirmação de que a cepa de *E. coli* DH5αλ pir adquiriu o p-JCB12, extraiu-se o plasmídeo JCB12, contendo o gene defeutivo e o seu marcador (Can^r ou Spc^r), para transferi-lo a outra cepa de *E. coli* S17.1 λ pir, conforme descrito no item 4.1.2.6 e 4.1.2.7. Neste caso, misturou-se 4 µL da solução do plasmídeo com 80µL da suspensão de células de *E. coli* S17.1 λ pir, prosseguindo conforme descrito anteriormente, sendo a cultura semeada em ágar LB contendo cloranfenicol mais canamicina ou espectinomicina.

As colônias bacterianas foram purificadas em ágar LB acrescido dos discos de antibiótico cloranfenicol (30µg), ampicilina (25µg) e canamicina (30µg) ou espectinomicina (50µg) e avaliadas pela técnica da PCR, conforme foi utilizado para *E. coli* DH5αλ pir.

4.1.2.9. Conjugação do gene defeutivo (Can^r ou Spc^r) em *Salmonella* Typhimurium.

O gene defeutivo, agora em *E. coli* S17.1λ pir, está pronto para ser inserido no recipiente final, *Salmonella* Typhimurium, cepa resistente ao ácido nalidíxico.

As culturas de *E. coli* S17.11λ pir e STM Nal^r, foram preparadas, individualmente, em ágar LB incubado a 37°C por 24 horas. Com auxílio de uma alça bacteriológica, o crescimento das duas culturas foi misturado e espalhado na superfície de ágar LB, que foi incubado a 37°C por 90 minutos. Usando a alça bacteriológica, o crescimento foi colhido e adicionado a 10 mL de caldo LB, que foi espalhado, também com alça, sobre a superfície de ágar LB contendo ácido nalidíxico (20µg/mL) e canamicina ou espectinomicina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias emergentes foram semeadas em ágar LB contendo discos impregnados com os antibióticos ácido nalidíxico (30µg), cloranfenicol e canamicina ou espectinomicina.

Colônias bacterianas Nal^r, Can^r ou Spc^r e C^s, foram submetidas à prova de aglutinação frente ao soro contendo anticorpos anti Fator 4 (Difco). Posteriormente, prova semelhante foi realizada utilizando-se uma solução de acriflavina (0,001%) para certificar-se que não se tratava de cepa rugosa.

As colônias O4 (+) e acriflavina (-) foram submetidas à PCR para caracterização definitiva do mutante desejado.

A reação da PCR foi realizada utilizando-se os *primers* 1 + 4 de cada mutante, sendo que, para o gene NarG, acrescentou-se um teste a mais com os *primers* 1 + 5.

4.1.2.10. Transdução

O preparo de mutantes de STM contendo dois genes defectivos foi realizado por meio de transdução.

As cepas de *Salmonella* Typhimurium contendo os genes defectivos *cbiA* Can^r, *torC* Can^r e *narG* Can^r (cepas doadoras), foram cultivadas individualmente em 10 mL de caldo LB, que foi incubado a 37°C por 24 horas. Essas culturas contêm aproximadamente 10⁹ UFC/mL. Foi adicionado o volume de uma solução de bacteriófago P22 (ØP22), para se obter uma

relação de 0,03Ø/ 1 bactéria. A mistura foi incubada a 37°C por 24 horas, estática.

A seguir, centrifugou-se o cultivo a 4000rpm/4°C/25minutos, filtrou-se o sobrenadante (45µm) e procedeu-se à contagem do ØP22 em ágar LB com camada de *Salmonella* Typhimurium F98. Prosseguindo, preparou-se culturas de STM F98 contendo os genes defectivos *cobS* Spc^r, *napA* Spc^r e *dmsA* Spc^r. Antes da adição do bacteriófago, a cultura foi centrifugada, conforme descrito acima e ressuspensa em 1 mL de caldo LB. Neste caso, a relação ØP22/STM F98 deverá ser de 0,8/1,0. O ØP22 cultivado em STM Δ *cbiA* Can^r foi adicionado à cultura de STM Δ *cobS* Spc^r. O ØP22 cultivado em STM Δ *torC*⁻ Can^r foi adicionado à cultura de STM Δ *dmsA* Spc^r. O ØP22 cultivado em STM Δ *narG* Can^r foi adicionado à cultura de STM Δ *napA* Spc^r. A mistura foi incubada a 37°C/30 minutos, estática, e depois espalhada em placas de ágar LB contendo ácido nalidíxico (20µg/mL) e canamicina (30µg/mL), que foi incubado a 37°C/24horas. Colônias emergentes foram purificadas em ágar LB mais discos de antibiogramas impregnados com os antibióticos ácido nalidíxico (30µg/mL), canamicina (30µg/mL) e espectomicina (50µg/mL), sendo incubadas a 37°C/24horas. Após testes de aglutinação com soro e prova semelhante utilizando-se uma solução de acriflavina, colônias emergentes foram submetidas à técnica da PCR para confirmação dos resultados.

Tabela 1. Pesos moleculares (PM) do gene original e do gene defeutivo *napA*, *narG*, *frdA*, *cbiA*, *cobS*, *torC* e *dmsA*.

GENES							
	<i>napA</i>	<i>narG</i>	<i>frdA</i>	<i>cobS</i>	<i>cbiA</i>	<i>torC</i>	<i>dmsA</i>
PM original (bp)	2486	3743	1790	994	1360	1185	2445
PM gene defeutivo (bp)	1030	1013	1060	964	930	1060	1160

4.2- Ensaios *in vivo*

Esses ensaios seguiram os modelos adotados por BERCHIERI *et al.* (2001).

4.2.1- Amostra bacteriana

Nestes ensaios foram utilizados os mutantes de STM contendo os genes defeitivos *napA*, *frdA*, *dmsA*, *cobS*, *cbiA*, *narG* e aqueles com alteração dupla *cobScbiA* e *torCdmsA*. Para o desenvolvimento do trabalho, o desafio das aves do grupo controle foi realizado, utilizando-se uma cepa de *Salmonella* Typhimurium resistente espontaneamente ao ácido nalidíxico (STM Nal^r).

4.2.2- Preparo dos inóculos de *Salmonella* Typhimurium

As culturas de STM foram preparadas em 10 mL de caldo LB a 37°C por 24 horas em agitação (100rpm). Posteriormente a cultura foi diluída em solução salina tamponada pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10 e diluídas decimalmente até 10⁻⁶. De cada diluição transferiu-se 0,1 de cada para uma placa contendo ágar VB o qual foi incubado por 24h a 37°C. Decorrido este

período, procedeu-se a contagem bacteriana. As culturas continham em torno de 10^8 UFC/mL.

4.2.3- Aves

Foram utilizados pintainhos de corte de um dia de idade de linhagem comercial procedentes de um incubatório localizado no Estado de São Paulo.

O alojamento foi feito em bateria com aquecimento artificial. As aves receberam alimento e água "*ad libitum*". A ração foi à base de milho e soja.

No momento do recebimento das aves, amostras de mecônio do fundo das caixas de transporte foram colhidas segundo metodologia adotada por ZANCAN *et al.* (2000). Os suabes foram colocados em tubos contendo caldo selenito (Oxoid CM 395 e LP 121A), adicionado de novobiocina (SN). Após incubação a 37°C por 24 horas, os caldos foram semeados em placas contendo ágar Verde Brilhante (Oxoid CM 0263) (VB), que foram incubadas a 37°C por 24 horas.

4.2.4- Infecção de aves por mutantes de *Salmonella* de STM contendo genes defectivos relacionados ao sistema de respiração anaeróbica.

4.2.4.1- Experimento 1

As aves foram inoculadas no primeiro dia de vida, recebendo 0.1 mL do inóculo por via intraesofágica.

Neste experimento, o inóculo consistia de cultura de STM preparada em caldo LB incubado a 37°C/24 horas em agitação e diluída, também, em caldo LB a 10^{-3} . Este inóculo continha aproximadamente 10^5 UFC/mL. Foram formados nove grupos de 20 aves cada. Foram preparados inóculos de STM,

cepas STM $\Delta dmsA$ Spc^r, STM $\Delta cobS$ Spc^r, STM $\Delta frdA$ Spc^r, STM $\Delta napA$ Spc^r, STM $\Delta cbiA$ Can^r, STM $\Delta narG$ Can^r, STM $\Delta torC$ Can^r $\Delta dmsA$ Spc^r, STM $\Delta cobS$ Spc^r $\Delta cbiA$ Can^r e a cepa original STM Nal^r (grupo controle).

As aves foram examinadas durante 21 dias, registrando-se a mortalidade e os sinais clínicos apresentados. No 21^o de vida, as aves remanescentes foram sacrificadas e, utilizando-se suabe de algodão, amostras de conteúdo cecal foram colhidas e colocadas em tubos contendo 2 mL de caldo SN. Após agitação, as amostras foram semeadas em ágar VB contendo ácido nalidíxico e novobiocina (VBNal/Nov). A seguir, placas e tubos foram incubados a 37°C durante 24 horas. Na ausência do crescimento em ágar VBNal/Nov, o suabe correspondente foi novamente semeado em placas contendo ágar VBNal/Nov, incubadas a 37°C/24h. Decorrido este período, procedeu-se à leitura das placas.

4.2.4.2- Experimento 2

As aves foram inoculadas no primeiro dia de vida, recebendo 0.1 mL do inóculo por via intraesofágica.

Neste experimento, o inóculo consistia de cultura de STM preparada em caldo LB incubado a 37°C/24 horas em agitação e diluída, também, em caldo LB a 10⁻². Este inóculo continha aproximadamente 10⁶ UFC/mL. Foram formados seis grupos de 60 aves cada. Foram preparados inóculos de STM, cepas STM $\Delta dmsA$ Spc^r, STM $\Delta cbiA$ Can^r, STM $\Delta frdA$ Spc^r, STM $\Delta narG$ Can^r, STM $\Delta cobS$ Spc^r $\Delta cbiA$ Can^r e a cepa original STM Nal^r para o desafio do grupo controle.

À semelhança do experimento *in vivo* anterior, as aves foram examinadas durante 21 dias, registrando-se a mortalidade e os sinais clínicos apresentados. No 21^o de vida, as aves remanescentes foram sacrificadas e realizou-se o exame bacteriológico destas aves por meio de suabes de fígado e conteúdo cecal, os quais foram processados, individualmente, para avaliação

da infecção sistêmica e excreção fecal respectivamente. As amostras do conteúdo cecal e do fígado foram colhidos com suabes de algodão estéreis, os quais foram colocados em tubos contendo caldo SN. Após da agitação as amostras foram semeadas em ágar VB Nal/Nov. A seguir, placas e tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Na ausência de crescimento em ágar VBNal/Nov, o suabe correspondente foi novamente semeado em placas contendo ágar VBNal/Nov, incubadas a 37°C por 24 horas. Decorrido este período, procedeu-se à leitura das placas.

4.3 - Análise estatística

Os dados relativos à mortalidade foram analisados pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado com nível de significância de 5% (GREENWOOD & NIKULIN, 1996).

V. RESULTADOS

5.1- Preparo de mutantes de STM para estudo de genes envolvidos no processo de respiração anaeróbica.

A Figura 1 ilustra as etapas iniciais do preparo do gene defeutivo.

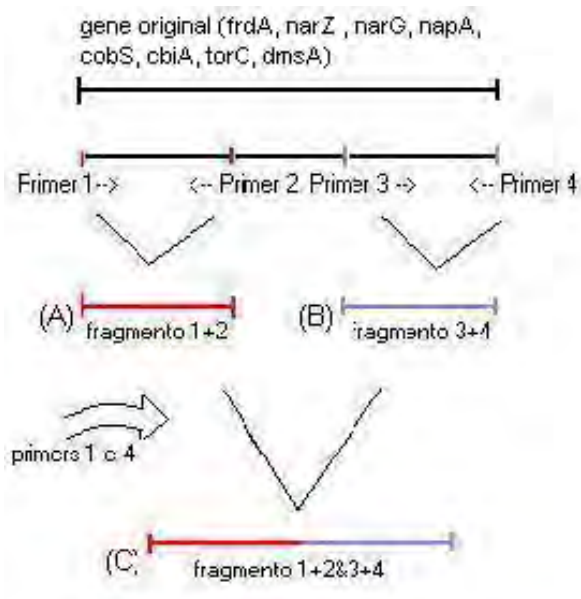


Figura 1: Esquema da formação dos fragmentos 1+2 e 3+4 do gene defeutivo (1+2 e 3+4) a partir dos genes originais de *napA*, *narG*, *frdA*, *cbiA*, *cobS*, *torC* e *dmsA*. (A): Obtenção do fragmento 1+2 através da realização de uma PCR com *primers* 1 e 2. (B): Obtenção do fragmento 3+4 através da realização de uma PCR com *primers* 3 e 4. (C): Obtenção do gene defeutivo após união dos fragmentos 1+2 e 3+4 através da realização de PCR com *primers* 1 e 4.

Nas figuras de 2 a 10 estão as fotos relativas aos resultados da PCR, mostrados na forma de migração em agarose, referentes aos genes defetivos *cbiA*, *cobS* e *dmsA*, *narG*, *frdA*, *napA* (*Can^r* ou *Spc^r*) inseridos em STM *Nal^r*. As figuras 9 e 10 referem-se aos mutantes que receberam dois genes defetivos (STM *cobScbiA* e STM *torCdmsA*).

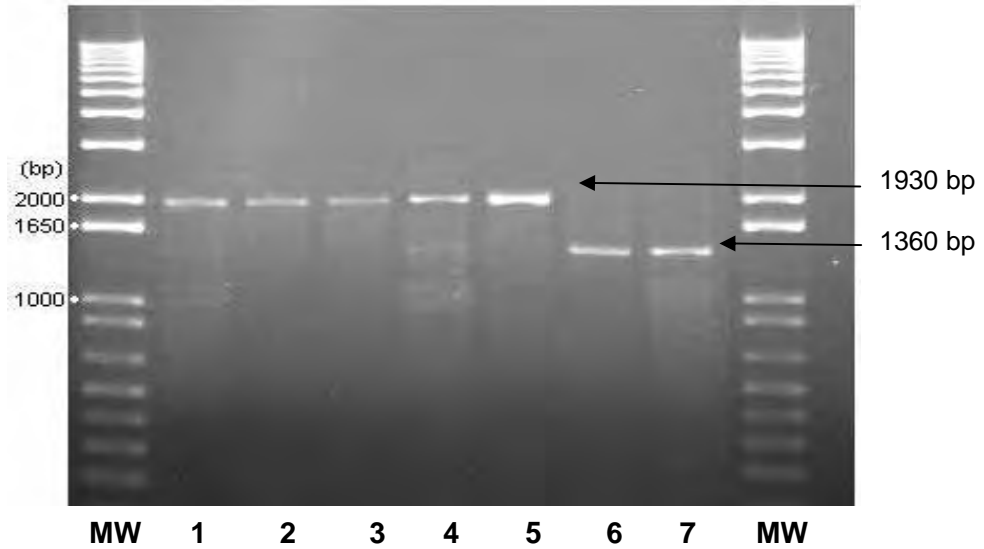


Figura 2: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *cbiA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: Marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 5: fragmento de STM Δ *cbiA* *Can*^r (1930bp). Bandas 6 e 7: fragmento STM *cbiA* (original) (1360bp).

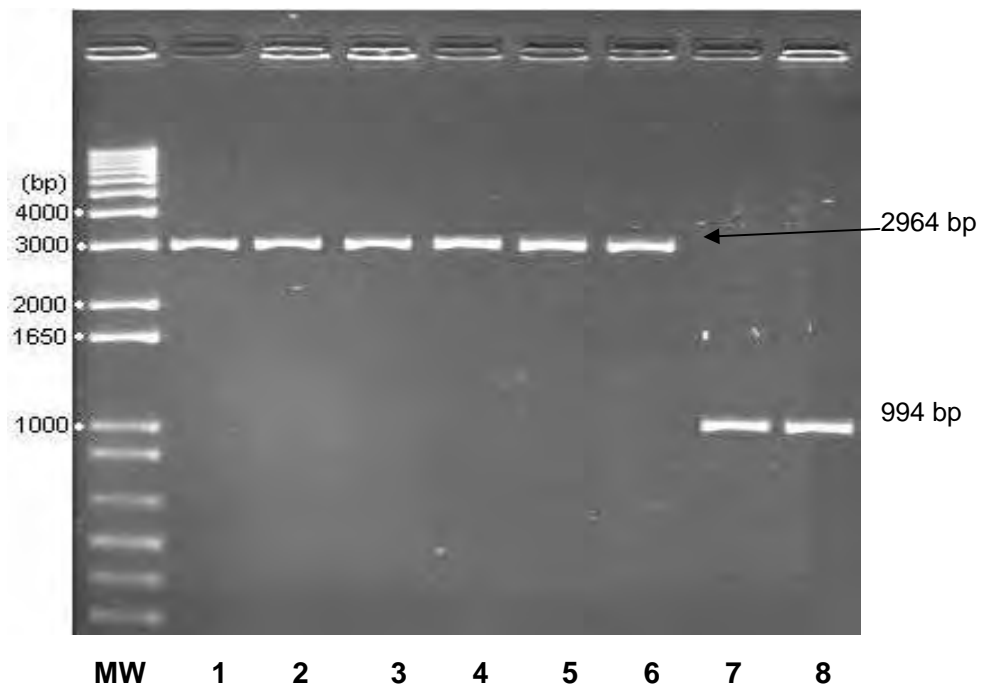


Figura 3: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *cobS* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 6: fragmento de STM Δ *cobS* *Spc*^r (2964bp). Bandas 7 e 8: fragmento de STM *cobS* (original) (994bp).

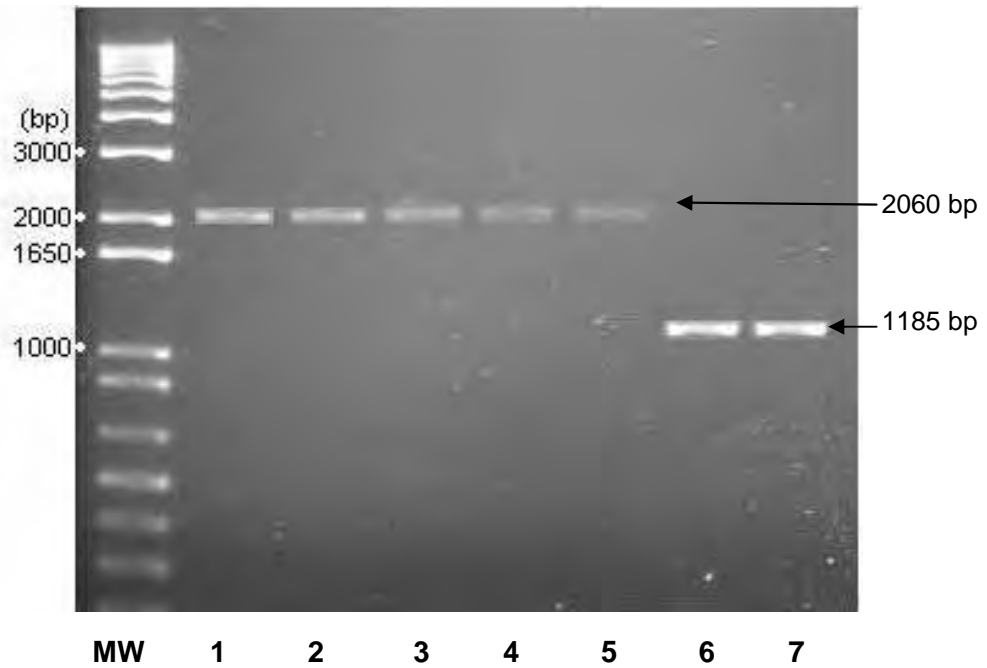


Figura 4: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *torC* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 5: fragmento STM Δ *torC* Can^r (2060bp). Bandas 6 e 7: fragmento STM *torC* (original) (1185bp).

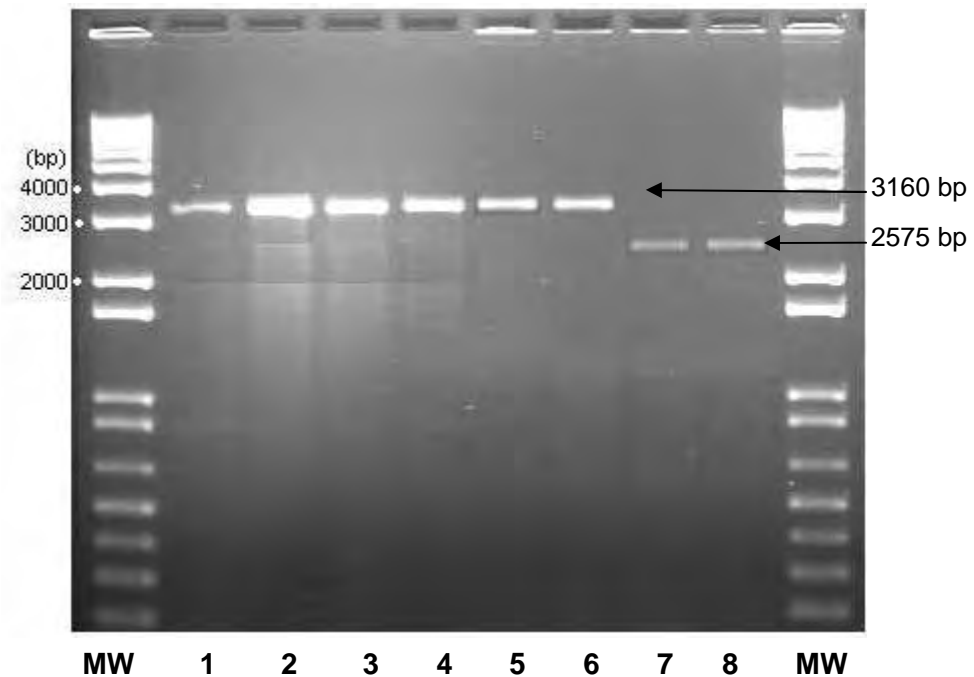


Figura 5: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *dmsA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 6: fragmento STM Δ *dmsA* Spc^r (3160bp). Bandas 7 e 8: fragmento STM *dmsA* (original) (2575bp).

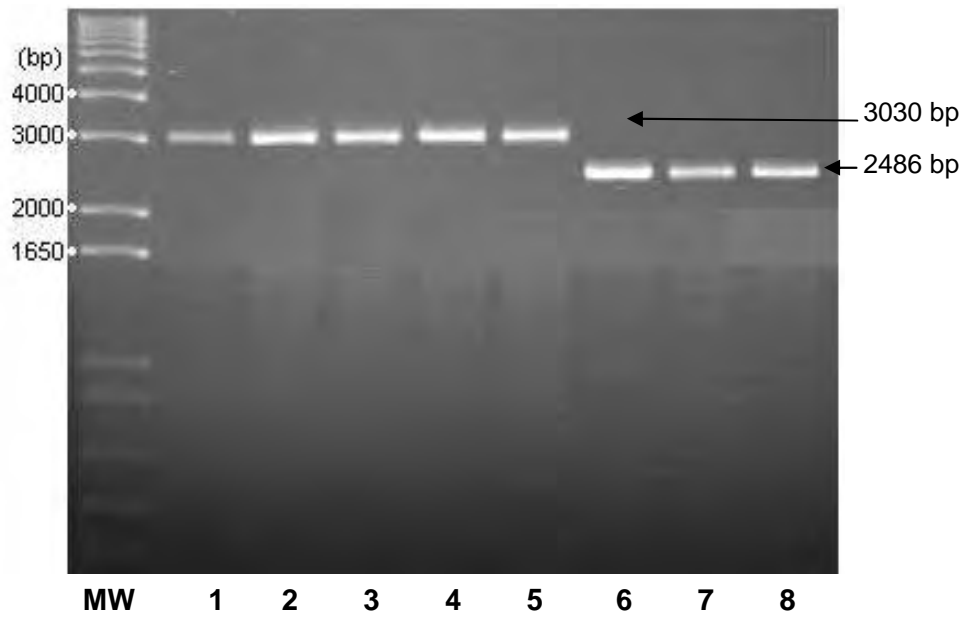


Figura 6: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *napA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 5: fragmento STM $\Delta napA$ Spc^I (3030bp). Bandas 6 a 8: fragmento STM *napA* (original) (2486bp).

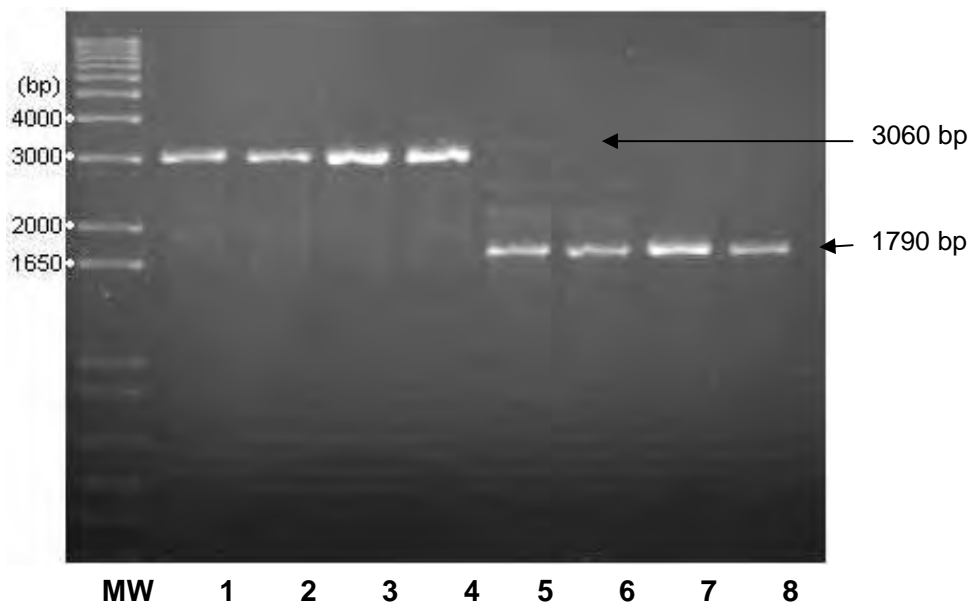


Figura 7: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *frdA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 4: fragmento STM $\Delta frdA$ Spc^I (3060bp). Bandas 5 a 8: fragmento STM *frdA* (original) (1790bp).

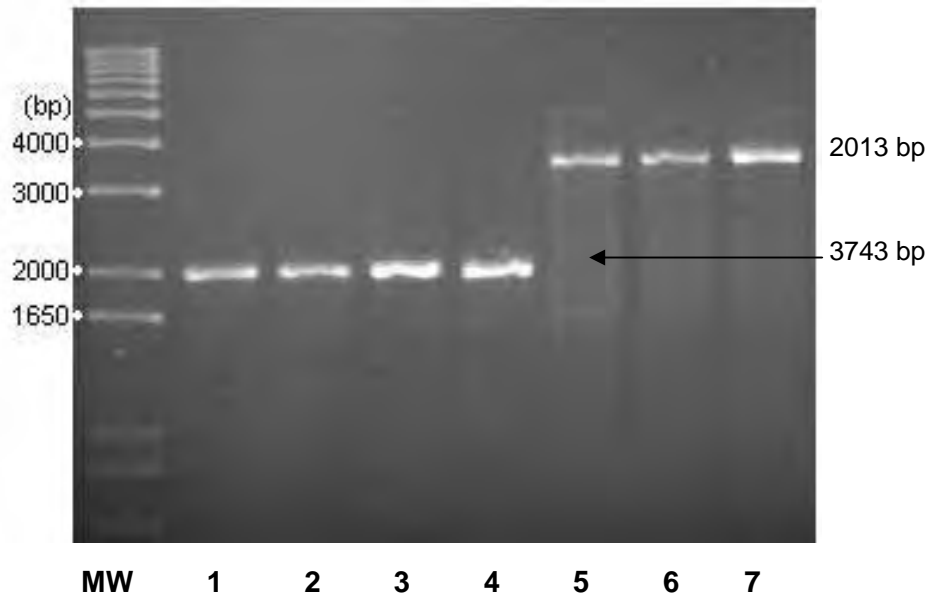


Figura 8: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *narG* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 4: fragmento STM $\Delta narG$ Can^r (2013bp). Bandas 5 a 7: fragmento STM *narG* (original) (3743bp).

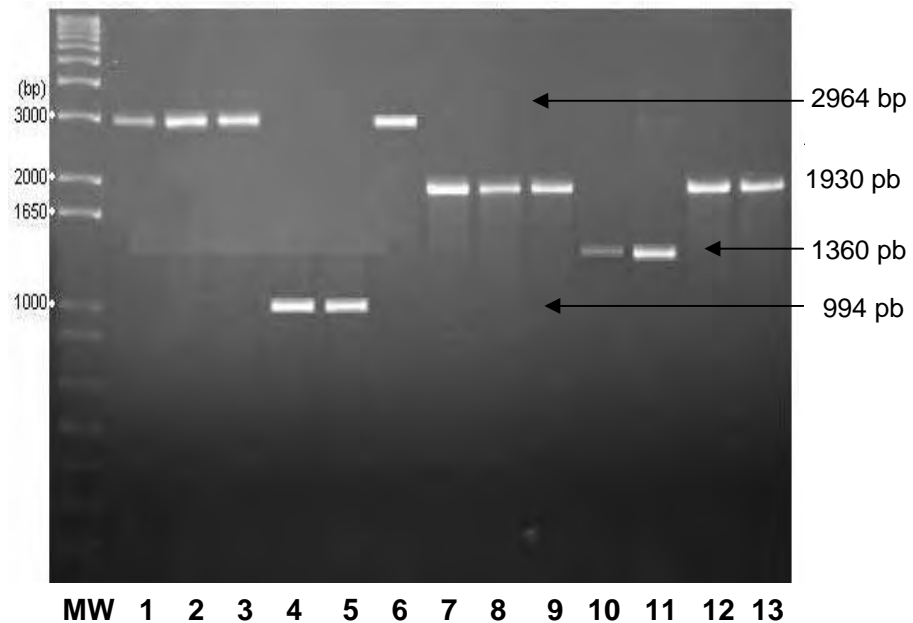


Figura 9: Eletroforograma apresentando a amplificação dos genes *cobS* e *cbiA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 3: fragmento STM $\Delta cobS$ Spc^r (2964bp). Bandas 4 e 5: fragmento STM *cobS* (original) (994bp). Banda 6: *Salmonella* Typhimurium F98 $\Delta cobS$ Spc^r (2964bp). Bandas 7, 8 e 9: fragmento STM $\Delta cbiA$ Can^r (1930bp). Bandas 10 e 11: fragmento STM *cbiA* (original) (1360bp). Banda 12 e 13: *Salmonella* Typhimurium F98 *cbiA* Can^r (1930bp).

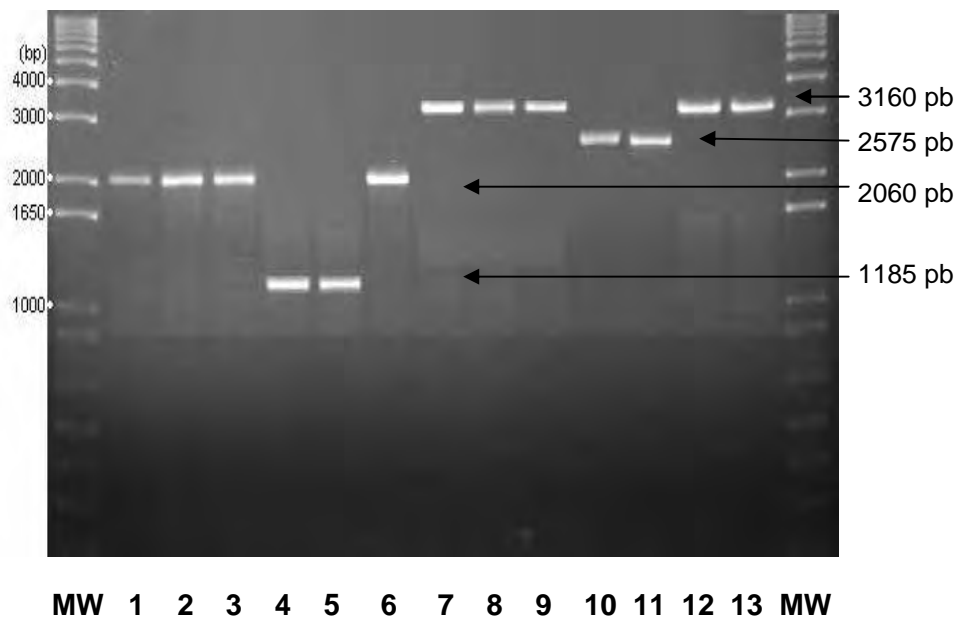


Figura 10: Eletroforograma apresentando a amplificação do gene *torC* e *dmsA* de STM em gel de agarose a 1%. MW: marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder). Bandas 1 a 3: fragmento STM Δ *torC* *Can*^r (2060bp). Bandas 4 e 5: fragmento STM *torC* (original) (1185bp). Banda 6: *Salmonella* Typhimurium F98 *torC* *Can*^r (2060bp). Bandas 7, 8 e 9: fragmento STM Δ *dmsA* *Spc*^r (3160bp). Bandas 10 e 11: fragmento STM *dmsA* (original) (2575bp). Banda 12 e 13: *Salmonella* Typhimurium F98 *dmsA* *Spc*^r (3160bp).

5.2- Infecção de aves por mutantes de STM contendo genes defectivos relacionados ao sistema de respiração anaeróbica.

5.2.1 Experimento 1

No momento da chegada das aves, as amostras de suabes do fundo da caixa de transporte de pintos de um dia de vida, apresentaram-se negativas na pesquisa de *Salmonella* spp.

Neste experimento foi avaliada a mortalidade de aves infectadas pela via intra-esofágica com mutantes de *Salmonella* Typhimurium no primeiro dia de vida. Todos os pintainhos receberam 0,1 mL de cultura de STM, preparada e diluída a 10^{-3} . Abaixo estão as contagens de STM nos inóculos:

Cepa	Contagens dos inóculos
STM Nal ^r	3,2 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta narG$	2,3 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta frdA$	5,2 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta dmsA$	2,3 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta cbiA$	3,2 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta cobS$	1,7 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta napA$	8,0 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta cobS\Delta cbiA$	3,3 x 10 ⁵ UFC/mL
STM Nal ^r $\Delta torC\Delta dmsA$	5,0 x 10 ⁵ UFC/mL

Após a infecção, as aves foram observadas diariamente. Clinicamente, a partir do 3º dia pós-inoculação (dpi), os pintainhos apresentaram sonolência, apatia, fraqueza e anorexia. Ao redor da cloaca, observou-se acúmulo de fezes, às vezes marrom-esverdeada. A mortalidade começou a partir do 4º dpi. Observou-se incoordenação motora a partir do 7º dpi, verificando-se edema das articulações tíbiotarsal e húmeroradial com claudicação. Ocorreram também, tremores na cabeça e no pescoço, semelhantes a calafrios e a maioria dos animais doentes apresentaram cegueira (uni ou bilateral) (Figura 11). Depois do 16º dpi, os pintainhos começaram a se recuperar, notando-se aumento nos consumos de alimento e água. Em geral, os sintomas

apresentados pelas aves infectadas com as cepas mutantes foram semelhantes aos apresentados pelas aves do grupo controle.



Figura 11. Alteração ocular em pintainho infectado com cultura de STM no 12^o dpi.

Os resultados relativos à mortalidade estão na Tabela 2. A mortalidade foi mais acentuada, com relação ao grupo controle, nas aves infectadas com os mutantes STM $\Delta dmsA$ e STM $\Delta cbiA$. Mortalidade semelhante ao grupo controle ocorreu com as aves infectadas com a cepa STM $\Delta torC\Delta dmsA$ e menor mortalidade de aves infectadas com os mutantes contendo os genes defectivos STM $\Delta cobS$, STM $\Delta narG$, STM $\Delta frdA$, STM $\Delta napA$, STM $\Delta cobS\Delta cbiA$. No grupo em que as aves foram infectadas com o mutante STM $\Delta narG$ observou-se diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo de aves infectadas com a cepa controle (χ^2 , $p < 0.05$).

Tabela 2. Mortalidade de aves infectadas com cepas de *Salmonella* Typhimurium contendo genes defectivos associados à respiração anaeróbica, desafiadas com cultura diluída a 10^{-3} , contendo aproximadamente 10^5 UFC/mL.

Gene defectivo	Mortalidade acumulativa dias pós-infecção																	Total				
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	N./Total	(%)	Ce (%)	
<i>narG</i>				1							2									2/20*	10	100%
<i>frdA</i>			1		4	5				6								7		7/20	35	100%
<i>dmsA</i>			1		2	5			6	7		8	9					10		10/20	50	100%
<i>cbiA</i>			1	5	6		7	8		9	10								10	10/20	50	100%
<i>cobS</i>		1	2		3	4	5	6										6		6/20	30	100%
<i>napA</i>	1		4			5		6	7										7/20	35	100%	
<i>cobS</i>			1	2					3		4								4/20	20	100%	
<i>cbiA</i>																						
<i>torC</i>		1	2		5		6						7	8					8/20	40	100%	
<i>dmsA</i>																						
C		1	3	4	5				6	7	8								8/20	40	99,9%	

C: Grupo controle *Salmonella* Typhimurium (cepa selvagem). Ce: ceco.

*Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (χ^2 , $p < 0.05$).

Aos 21 dias de vida, as 130 aves restantes foram sacrificadas, realizando-se suabe de conteúdo cecal desses animais. Em todos os grupos de aves se verificou a presença de *Salmonella* Typhimurium, com exceção de um animal do grupo controle. Os achados na necropsia demonstraram as alterações sistêmicas causadas pela infecção (Figura 12).

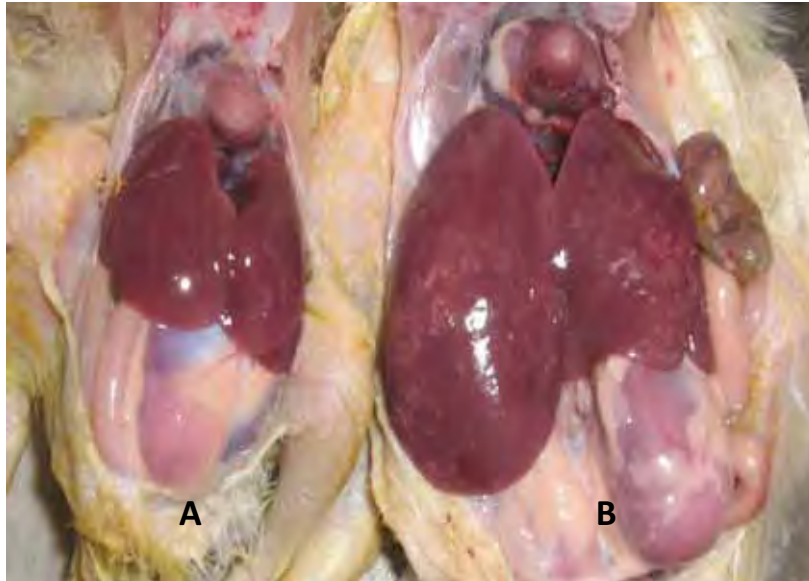


Figura 12. Comparação de aves do grupo controle infectadas com *Salmonella* Typhimurium. (A) Ave com fígado normal. (B) Ave com fígado alterado, observe-se aumento de tamanho e presença de pontos necróticos.

5.2.2- Experimento 2.

No momento da chegada das aves, as amostras de suabes de fundo de caixa de transporte de pintos de um dia de vida, apresentaram-se negativas na pesquisa de *Salmonella* spp.

Foi avaliada a mortalidade de aves infectadas pela via intraesofágica, com mutantes de *Salmonella* Typhimurium no primeiro dia de vida. Todos os pintainhos receberam 0,1 mL de cultura diluída a 10^{-2} de STM. Abaixo estão as contagens das culturas de STM:

Cepa	Contagens do inóculo
STM Nal ^r	4,1 x 10 ⁶ UFC/mL
STM Nal ^r ΔnarG	2,2 x 10 ⁶ UFC/mL
STM Nal ^r ΔfrdA	4,2 x 10 ⁶ UFC/mL
STM Nal ^r ΔdmsA	3,5 x 10 ⁶ UFC/mL
STM Nal ^r ΔcbiA	3,5 x 10 ⁶ UFC/mL
STM Nal ^r ΔcobSΔcbiA	3,3 x 10 ⁶ UFC/mL

Na Tabela 3 encontram-se os resultados dos ensaios *in vivo* com STM. Neste teste foram utilizados cinco grupos de aves desafiadas com os mutantes de STM, cepas ΔdmsA, ΔfrdA, ΔcbiA, ΔnarG, ΔcobSΔcbiA e um grupo controle o qual foi desafiado com a cepa original (selvagem). Em nenhum grupo desafiado com cepas mutantes a mortalidade foi maior que a do grupo controle. As aves infectadas com as cepas mutantes de STM ΔnarG, ΔdmsA, ΔfrdA e ΔcobSΔcbiA apresentaram diminuição significativa da mortalidade comparada com o grupo controle (χ^2 , $p < 0.05$).

Tabela 3. Mortalidade de aves infectadas com cepas de *Salmonella* Typhimurium contendo genes defectivos associados à respiração anaeróbica, desafiadas com cultura diluída a 10^{-2} , contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL.

Gene	Mortalidade acumulativa dias pós-infecção																					Total %		Suabes (+) aves restantes	
	Defectivo	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Núm. Total	%	F %	Ce %			
narG		5	14	20	21	22	23			24	27	28	29				30		30/60*	50	31	100			
frdA		3	10	15	19	21	22	24	25		26	29								29/60*	48	40	100		
dmsA		2	13	17	21	23	24	25	26	27		28	29	30						30/60*	50	39	100		
cbiA		3	12	16	21	25				26	30	32	33	35						35/60	58	33	100		
cobS cbiA		2	14	19	23	26	27	28	29			30								30/60*	50	25	100		
C		3	11	15	19	24		28	32	36	41	43	45		46					46/60	77	33	100		

C: Grupo controle *Salmonella* Typhimurium (cepa selvagem). F: Fígado. Ce: Ceco. *Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (χ^2 , $p < 0.05$).

Aos 21 dias de vida, as aves restantes foram sacrificadas, realizando suabes de conteúdo cecal desses animais. Nos cecos de todas as aves inoculadas, foi verificada a presença de *Salmonella* Typhimurium. Os achados na necropsia foram compatíveis com as alterações sistêmicas causadas pela infecção de aves por STM (Figura 13 e 14).



Figura 13. Fígado encontra-se congestionado, aumentado de tamanho e com presença de pontos necróticos de ave infectada com STM $\Delta cbIA$.



Figura 14. Aves infectadas com STM $\Delta cobS$. (A) Ave com fígado e baço congestionado, aumentado de tamanho e com presença de pontos necróticos. (B) Ave com fígado e baço normal.

VI. DISCUSSÃO

Salmonella Typhimurium é um parasita intracelular, anaeróbico facultativo que está entre os agentes do Paratifo Aviário. Embora os fatores de virulência sejam responsáveis pelo desencadeamento e evolução da doença (VAN IMMERSEL *et al.*, 2005), durante o parasitismo intracelular, a bactéria dispõe de vários recursos metabólicos para sobreviver. Dentre esses recursos, encontram-se os mecanismos de respiração em anaerobiose. A célula hospedeira contém diversas substâncias que podem ser utilizadas como substrato para a produção de energia. A bactéria os aproveita conforme sua necessidade e disponibilidade. Para isso, dispõe de sistemas enzimáticos que são acionados visando a sua sobrevivência. Em algumas situações, um sistema enzimático inibe a atuação do outro (GENNIS & STEWART, 1996).

Em geral, os conhecimentos gerados a respeito da infecção por *Salmonella* spp. foram obtidos em estudos utilizando camundongos como modelo animal (MITTRUCKER & KAUFMANN, 2000). Embora esses estudos sejam importantes, ressalta-se que existem diferenças entre os sistemas imunes de mamíferos e de aves (LANGMAN & COHN, 1993), de forma que a resposta imune à infecção pode diferir entre os animais domésticos (SOWDER *et al.*, 1988).

Muitos sorotipos de *Salmonella* spp. já foram isolados de aves com ou sem o quadro da enfermidade. A relação parasita-hospedeiro com a ave difere entre eles. De acordo com Paulin *et al.* (2002), nas etapas da patogênese de *Salmonella* spp. incluem-se a indução de resposta imune, invasão intestinal e proliferação sistêmica. A patogenicidade de salmonelas paratíficas depende de uma série de fatores associados à bactéria, à ave e às condições de criação. Alguns sorotipos são mais restritos ao trato intestinal, enquanto outros são capazes de invadir a corrente circulatória, podendo desencadear septicemia (COOPER, 1994).

O paratifo aviário tem como agente etiológico salmonelas não adaptadas às aves, as quais podem causar doença clínica e comprometer a produção avícola, acarretando perdas econômicas (BARROW, 1993), como também podem infectar as aves sem que haja manifestações clínicas aparentes. Segundo Barrow (2000), dentro das alterações do paratifo aviário são encontrados pintainhos com anorexia, asas caídas, cegueira, claudicação, as aves tendem a amontoarem-se, apresentam diarreia, retardo no crescimento, morbidade e mortalidade.

No presente trabalho, os primeiros sintomas foram observados a partir do 5º dpi, constituindo-se de sonolência, anorexia, penas eriçadas, retardo no crescimento, cegueira e diarreia. No decorrer dos experimentos, encontrou-se um quadro persistente de diarreia, o que levou à desidratação dos animais, sendo, possivelmente, a causa da morte. Essas alterações são decorrentes da capacidade das salmonelas entéricas de produzir toxinas, invadir a mucosa, causar lesões e provocar a perda de fluidos (FIERER & GUINEY, 2001; OHL & MILLER, 2001; CANO *et al.*, 2003). Segundo Zhang *et al.* (2003), o sorotipo Typhimurium é mais eficiente em invadir e destruir o epitélio intestinal que outros sorotipos de *Salmonella*.

Outro achado importante, levado em consideração na presente pesquisa, foi à presença de opacidade de córnea em aves de todos os grupos. Esta alteração, na maioria dos casos, estava acompanhada de conjuntivite (uni ou bilateral). Estes achados são similares aos descritos por Jacob *et al.* (1998), que observaram conjuntivite purulenta, panoftalmia e cegueira em aves acometidas por STM. As alterações oculares, caracterizadas pela presença de exudado caseoso na câmara anterior do olho, devem-se à atividade das células de defesa e estão associadas à infecção sistêmica (NAKAMURA & ABE, 1987).

A morbidade e mortalidade dependem da intensidade da infecção e do sorotipo de *Salmonella* spp. Quanto mais invasiva a salmonela, mais agressiva ela será e mais severo será o quadro da doença (BERCHIERI, 2000). Aves jovens são mais susceptíveis a enfermidade paratífica, onde a mortalidade e a morbidade ocorrem durante as primeiras duas semanas de vida, podendo

também, ocasionar retardo no crescimento (MEAD & IMPEY, 1987; HINTON *et al.*, 1991; GAST, 1997). Esta susceptibilidade deve-se à ausência de uma flora intestinal completa e pela imaturidade do sistema imune (Van DER WIELEN *et al.*, 2000; FRIEDMAN *et al.*, 2003). No presente experimento, as aves foram infectadas no primeiro dia de vida, época em que são mais susceptíveis e que é mais comum a disseminação de salmonelas paratíficas entre as aves (COX *et al.*, 1990). A mortalidade foi maior quando as aves receberam o inóculo mais concentrado, demonstrando que a gravidade da enfermidade é dose dependente.

O ceco é o principal local de multiplicação das salmonelas paratíficas no organismo da ave, enquanto que o baço e o fígado são considerados os principais órgãos não intestinais, onde a bactéria pode ser encontrada (GORHAM *et al.*, 1991). A presença de *Salmonella* spp. nesses órgãos, deve-se ao parasitismo intracelular e não como um resultado de septicemia (BARROW *et al.*, 1987). Segundo Hassan *et al.* (1994), a infecção precoce provoca uma depleção transitória de linfócitos em órgãos linfóides, favorecendo o desenvolvimento do estado de portador em frangos de corte. No presente estudo, aos 21 dpi, sacrificou-se as aves sobreviventes, constatando-se em todas a presença de STM nas amostras de conteúdo cecal, enquanto que, no baço e no fígado, a recuperação esteve em torno de 30% das aves. Esses resultados mostram que, os animais sobreviventes tornam-se portadoras por algum tempo. Barrow *et al.* (1987), verificam que STM persistiu por 28 dpi nos cecos das aves, enquanto que Gast & Beard (1989), inoculando oralmente STM em pintainhos, na primeira semana de vida, notaram a persistência de *Salmonella* no ceco das aves por 35 dpi. Assim sendo, uma vez contaminadas, as aves tornam-se portadoras, podendo disseminar a bactéria por várias semanas. As aves infectadas podem excretar a bactéria, contaminar o meio ambiente, acarretando prejuízos devido à morbidade, mortalidade, desempenho insatisfatório do lote de aves, além de gastos em programas preventivos e com medicamentos (Mc MULLIN, 2004; PLYM, 2006).

Em razão da importância que STM tem em saúde animal e humana, este sorotipo tem sido escolhido para estudos laboratoriais *in vivo* e *in vitro*. *Salmonella* Typhimurium pode crescer sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, obtendo energia mediante processos metabólicos. O oxigênio tem alta afinidade na transferência de elétrons. Por esta razão, a respiração aeróbica representa a mais favorável forma de metabolismo energético. Mas na ausência de oxigênio, muitos microrganismos podem obter energia por processos respiratórios que resultam na redução de aceptores terminais alternativos (GOTTSCHALK, 1986).

Segundo Mahan *et al.* (1993), estudos baseados na função dos genes envolvidos na respiração anaeróbica, demonstram que existe uma correlação entre a expressão de alguns deles com o processo de invasão, com a finalidade de proporcionar a via energeticamente mais favorável para a sobrevivência e proliferação bacteriana. Moors & Portnoy (1995), em ensaios *in vivo* com camundongos, observaram diminuição da virulência de cepas de STM apresentando mutações em genes codificadores de enzimas que fazem parte das vias metabólicas do processo respiratório. Portanto, os genes responsáveis pela produção de enzimas que participam da respiração anaeróbica podem ser regulados em conjunto com genes que codificam a capacidade invasiva (BUCHNEIER *et al.*, 1989; SINGH *et al.*, 2000).

No presente trabalho foram preparadas cepas mutantes de STM com genes defectivos responsáveis pela produção de enzimas em ambiente anaeróbico. Essas cepas foram inoculadas em aves susceptíveis para observar a relação parasita-hospedeiro desses mutantes em comparação com a cepa patogênica original. Com exceção de STM $\Delta cbiA$, os demais apresentaram diminuição da capacidade de causar mortalidade em comparação com a cepa original, sendo esta diferença significativa para as cepas STM $\Delta narG$, STM $\Delta frdA$, STM $\Delta dmsA$ e STM $\Delta cobS\Delta cbiA$.

Dentro do processo experimental adotado, não é possível estabelecer as razões pelas quais as cepas mutantes tornaram-se menos patogênicas. Contudo, existem trabalhos que procuram elucidar esses mecanismos.

A enzima nitrato redutase (*narGHIJ*) é responsável pela produção de óxido nítrico. De acordo com Gilberthorpe & Poole (2008), mutantes de STM que carecem da enzima nitrato redutase na membrana citoplasmática são incapazes de produzir óxido nítrico. Utilizando este mecanismo, STM sobrevive e se prolifera dentro de macrófagos, estimulando respostas antimicrobianas como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (VAZQUEZ-TORRES & FANG, 2001) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), incluindo o óxido nítrico (FANG, 2004). O óxido nítrico produzido pelos macrófagos se converte em agente bactericida (óxido nitroso e S-nitrosotióis, entre outros) (STEVANIN *et al.*, 2002). Enterobactérias como STM e *E coli*, possuem enzimas capazes de metabolizar o óxido nítrico (JI *et al.*, 1988; CORKER & POOLE, 2001). Segundo Poole (2005), as principais enzimas neste processo são a flavohemoglobina (HmpA), expressada em aerobiose e a flavorubredoxina (NorV), expressada em anaerobiose, que transformam o óxido nítrico em uma substância menos nociva, convertendo-o, respectivamente, em nitrato (NO₃) ou óxido de nitrogênio (N₂O). Este autor ainda sugere, que a enzima *narGHIJ* pode reduzir nitrito a óxido nítrico. Estudos *in vitro* sugerem que este processo faz parte do mecanismo de inibição da ação do óxido nítrico, completando a redução do NO₃, produzindo uma substância menos tóxica (BANG *et al.*, 2002; GARDNER *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2002; STEVANIN *et al.*, 2002, 2007; MILLS *et al.*, 2008). De acordo com Pawaria *et al.* (2007), durante o ciclo infeccioso, o patógeno intracelular *Mycobacterium bovis* utiliza mecanismos bacterianos de proteção contra os efeitos tóxicos do óxido nítrico similares, aos apresentados por STM.

Existem evidências de que em *E coli* e STM, o fumarato tem um papel importante na obtenção de energia em condições de anaerobiose (JONES *et al.*, 1985; VAN HELLEMOND & TIELENS, 1994). Com a inibição da produção da enzima fumarato redutase, poderá ocorrer retardo no crescimento bacteriano (WEINER *et al.*, 1986; IVERSON *et al.*, 1999). Conforme os resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que a cepa STM Δ *frdA* provocou uma menor mortalidade de aves em comparação aos resultados

referentes à cepa original. Essa diminuição na mortalidade, devido a inativação do gene *frdA*, poderia ser justificada, pela função do fumarato e seus metabólitos como fatores que participam da ativação do processo de direção e rotação flagelar. O flagelo bacteriano gira devido à ativação de uma estrutura localizada na base flagelar (BERG *et al.*, 1982; EISENBACH, 1990; JONES *et al.*, 1991). Esta estrutura é dirigida por uma corrente de prótons que determina a direção e a rotação da bactéria (COHEN-BEN-LULU *et al.*, 2008). Este mecanismo, essencial na quimiotaxia está associado à enzima de membrana fumarato redutase (BARAK *et al.*, 1991). Assim sendo, pode-se considerar que a enzima fumarato redutase participaria da produção de energia para a movimentação flagelar. A motilidade é usualmente considerada fator de virulência de bactérias patogênicas (FRETER *et al.*, 1981; DIBB-FULLER *et al.*, 2000). No entanto, os mecanismos pelos quais ocorre este processo ainda não estão bem esclarecidos. É provável que os constituintes citoplasmáticos (incluindo outras proteínas quimiotáticas citoplasmáticas) sejam essenciais para esta função. Sendo o fumarato um aceptor natural de elétrons do sistema respiratório, ele poderia ser a conexão entre o metabolismo energético e o sistema quimiotático (KROGER, 1978; LIN *et al.*, 1987; BARAK & EISENBACH, 1991).

Em *Wolinella succinogenes* a enzima fumarato redutase está implicada na geração de ATP (REDDY & PECK, 1978), facilitando a formação de gradientes de prótons através da membrana citoplasmática (LANCASTER *et al.*, 2000; BIEL *et al.*, 2002). O fumarato seria a maior fonte de succinato em *Bacterioides fragilis* (MACY *et al.*, 1975; BAUGHN & MALAMY, 2002). Bactérias como *E. coli* requerem succinato para a síntese de succinyl-coA, como cofator essencial na biossíntese de metionina, ácido diaminopimelico e lisina (CLARK, 1989; BAUGHN *et al.*, 2003).

Dimetil sulfóxido (DMSO) é considerado um componente do ciclo do enxofre em condições anaeróbicas (SHAWN *et al.*, 2002). Diversos microrganismos têm a capacidade de reduzir DMSO a dimetil sulfeto (DMS), mas este mecanismo é pouco conhecido (BILOUS & WEINER, 1985; WEINER,

1988; MATSUZAKI *et al.*, 2006). A menor mortalidade das aves do grupo em que inoculou-se a cepa de STM $\Delta dmsA$, em comparação com o grupo de aves infectadas com a cepa selvagem, pode ser devido à dificuldade encontrada pela bactéria para se multiplicar em ambientes anaeróbicos; contudo, também pode ter sido em razão da associação deste gene com mecanismos de virulência bacteriana (SAMBASIVARAO *et al.*, 1991; WEINER *et al.*, 1992; BALTES *et al.*, 2003). A expressão da enzima *dmsA* está bem caracterizada dentro da virulência do *Actinobacillus pleuropneumonie*, agente etiológico da pleuropneumonia em suínos. A deleção do gene *dmsA* resulta na diminuição do quadro patológico na fase aguda de infecção (BALTES *et al.*, 2003).

A diminuição da mortalidade de aves inoculadas com o mutante $\Delta cobS\Delta cbiA$ pode estar correlacionado ao fato de que a cobalamina, sendo um cofator de várias enzimas que atuam no processo de respiração anaeróbica, seja importante para o desenvolvimento normal de STM. A síntese de cobalamina está limitada a poucos representantes das bactérias e *archaea* (MARTENS *et al.*, 2002; RODIONOV *et al.*, 2003; CROFT *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2008). Diversos derivados da vitamina B₁₂ atuam como cofatores de reações responsáveis pelo catabolismo anaeróbico de fontes de carbono (MAGGIO-HALL & ESCALANTE-SEMERENA, 1999). Segundo Price-Carter *et al.* (2001), mutantes defectivos quanto à síntese de B₁₂ apresentam crescimento anaeróbico debilitado.

Nos casos em que a deleção do gene não alterou o comportamento da cepa de STM em comparação ao grupo controle é possível se especular em dois sentidos. A alteração do gene não foi suficiente para inibir a síntese da enzima porque os demais genes envolvidos poderiam desenvolver mecanismos compensatórios ou então, que a enzima não seria essencial devido à presença de diversos substratos no interior da célula hospedeira. Segundo Moreno-Vivian (1998) as enzimas podem, às vezes, ter papéis distintos quando se encontram sob diferentes condições metabólicas. As vias respiratórias, assimilatórias e desassimilatórias, podem estar interconectadas para facilitar a rápida adaptação às condições aeróbicas e anaeróbicas, aumentando a capacidade metabólica para sobrevivência no hospedeiro.

Salmonella Typhimurium tem sido reconhecida como um dos principais agentes de salmonelose animal com repercussão em saúde pública, em decorrência da associação de caso humanos com a ingestão de produtos alimentícios de origem animal. O estudo da biologia de bactérias patogênicas não só oferece o conhecimento de processos fisiológicos dos microrganismos, como também, a respeito dos mecanismos de defesa utilizados para sobreviver em ambiente intracelular. Os resultados poderão contribuir para o conhecimento da fisiologia bacteriana durante a fase de parasitismo, podendo ser útil para o esclarecimento dos mecanismos de sobrevivência intracelular bacteriano e com isso, auxiliar no seu controle.

VII. CONCLUSÕES

Dentro do modelo experimental adotado, concluiu-se que:

- Em geral, os sintomas observados nas aves infectadas com as cepas mutantes foram semelhantes aos apresentados pelas aves do grupo controle, com destaque para a presença de diarreia e opacidade na córnea;
- No presente estudo, aos 21 dpi, foram sacrificadas as aves sobreviventes, constatando-se a presença de *Salmonella* nas amostras de conteúdo cecal de todas as aves examinadas, enquanto que, no baço e no fígado, a recuperação esteve em torno de 30% das aves;
- Nos grupos de aves infectadas com a cepa STM $\Delta narG$, inoculadas com cultura diluída a 10^5 , observou-se diminuição significativa da mortalidade em comparação ao grupo controle;
- Nos grupos de aves infectadas com as cepas STM $\Delta narG$, STM $\Delta frdA$, STM $\Delta cobS\Delta cbiA$ e STM $\Delta dmsA$, inoculadas com cultura diluída a 10^6 , observou-se diminuição significativa da mortalidade em comparação ao grupo controle.

VIII. REFERÊNCIAS

ABSHIRE, K. Z.; NEIDHARDT, F. C. Growth rate paradox of *Salmonella* Typhimurium within host macrophages. **J. Bacteriol.**, Michigan, v. 175, n. 12, p. 3744–3748, 1993.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, M. Molecular biology of the cell. In: GARLAND PUBLISHING (Ed.). New York, 1994, p. 342-366.

ALPUCHE-ARANDA, C.; BERTHIAUME, E. P.; MOCK, B.; SWANSON, J. A.; MILLER, S. Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. **J. Infectol. Immunol.**, Boston, v. 63, n. 11, p. 4456-4462, 1995.

ALPUCHE-ARANDA, C.; SWANSON, J.; LOOMIS, W.; MILLER, S. *Salmonella* Typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Boston, v. 89, n. 21, p. 10079–10083, 1992.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial ecology: In: BENJAMIN CUMMINGS PUBLISHING (Ed.). **Fundamentals and applications**. Redwood City, 1993, p. 563.

BAILEY, J.; COX, N.; CRAVEN, S.; COSBY, D. Serotype tracking of *Salmonella* through integrated broiler chicken operations. **J. Food. Prot.**, Atlanta, v. 65, n. 5, p. 742–745, 2002.

BALTES, N.; HENNIG-PAUKA, I.; JACOBSEN, I.; GRUBER, A. D.; GERLACH, G. F. Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection. **Infect. Immun.**, Hannover, v. 71, n. 12, p. 6784-6792, 2003.

BANG, I. S.; AUDIA, J. P.; PARK, Y. K.; FOSTER, J. W. Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. **Mol. Microbiol.**, Mobile, v. 44, n. 5, p. 1235-1250, 2002.

BARAK, R.; EISENBACH, M. Fumarate or a Fumarate Metabolite Restores Switching Ability to Rotating Flagella of Bacterial Envelopes. **J. Bacteriol.**, Rehovot, v. 174, n. 2, p. 643-645, 1991.

BARRETT, E.; KWAN, H. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. **Annu. Rev. Microbiol.**, Los Angeles, v. 39, p. 131-49, 1985.

BARRETT, E.; KWAN, H. S.; MACY, J. Anaerobiosis, formate, nitrate, and *pyrA* are involved in the regulation of formate hydrogenlyase in *Salmonella* Typhimurium. **J. Bacteriol.**, Los Angeles, v. 158, n. 3, p. 972-977, 1984.

BARRETT, E.; RIGGS, D. Evidence for a second nitrate reductase activity that is distinct from the respiratory enzyme in *Salmonella* Typhimurium. **J. Bacteriol.**, Los Angeles, v. 150, n. 2, p. 563-571, 1982.

BARROW, P. A. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathol.**, Sutton Bonington, v. 36, n. 1, p. 1-13, 2007.

BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Rev. Sci. Tech.**, Berkshire, v. 19, n. 2, p. 351-75, 2000.

BARROW, P. A. *Salmonella* control-past, present and future. **Avian Path.**, Berkshire, v. 22, 651–669, 1993:

BARROW, P. A.; HUGGINS M. B.; LOVELL, M.; SIMPSON, J. Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. **Rev. Vet. Sci.**, Huntington, v. 42, n. 2, p. 194–199, 1987.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; FROST, A. J.; BLAND, P. Prevention of salmonellosis in gnotobiotic pigs by pre-colonization with avirulent *Salmonella* strains. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *SALMONELLA* AND SALMONELLOSIS. ZOOPOLE DEVELOPMENT., Ploufragan, v. 20-22, p. 519-520, 1997.

BARROW, P. A.; LOVELL, M.; ZANG-BARBER, L. Growth suppression in early stationary phase nutrient broth cultures of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* in genus specific and not regulated by sigma. **J. Bacteriol.**, Berkshire, v. 178, n. 11, p. 3072-3076, 1996.

BAUGHN, A. D, MALAMY, M. H. The essential role of fumarate reductase in haem-dependent growth stimulation of *Bacteroides fragilis*. **Microbiol.**, Boston, v. 149, n. 6, p.1551-1558, 2003.

BAUGHN, A. D, MALAMY, M. H. A mitochondrial-like aconitase in the bacterium *Bacteroides fragilis*: implications for the evolution of the mitochondrial Krebs cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, Boston, v. 99, n. 7, p. 4662-4667, 2002.

BEHLAU, I.; MILLER, S. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells. **J. Bacteriol.**, Boston, v. 175, n. 14, p. 4475–4484, 1993.

BENNER, S. A.; ELLINGTON, A. D.; TRAVER, A. Modern metabolism is a palimpsest of the RNA world. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Zurich, v. 86, n. 18, p. 7054-7058, 1989.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses Aviárias. In: BERCHIERI, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000, p. 185-194.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C. E.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observation on the persistence and vertical transmission of *Salmonella* enterica serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001.

BERG, H. C.; MANSON, M. D.; CONLEY, M. P. Dynamics and energetics of flagellar rotation in bacteria. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, Cambridge, v. 35, p. 1–31, 1982.

BERG, B.; STEWART, V. Structural genes for nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. **Genet.**, New York, v.125, n. 4, p. 691-702, 1990.

BERKS, B. C.; FERGUSON, S. J.; MOIR, J. W. B.; RICHARDSON, D. J. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. **Biochim. Biophys. Acta.**, Norwich, v. 1232, n. 3, p. 97–173, 1995.

BIEL, S.; SIMON, J.; GROSS, R.; RUIZ, T.; RUITENBERG, M.; KRÖGER, A. Reconstitution of coupled fumarate respiration in liposomes by incorporating the electron transport enzymes isolated from *Wolinella succinogenes*. **Eur. J. Biochem.**, Frankfurt am Main, v. 269, n. 7, p. 1974-1983, 2002.

BILOUS, P. T.; WEINER, J. H. Molecular cloning and expression of the *Escherichia coli* DMSO reductase operon. **J. Bacteriol.**, Edmonton, v. 170, n. 4, p. 1511-1518, 1988.

BILOUS, P. T.; WEINER, J. H. Dimethyl sulfoxide reductase activity by anaerobically grown *Escherichia coli* HB101. **J. Bacteriol.**, Edmonton, v. 162, n. 3, p. 1151–1155, 1985.

BJUR, E.; ERIKSSON-YGBERG, S.; ASLUND, F.; RHEN, M. Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infect. immun.**, Stockholm, v. 74, n. 9, p. 5140–5151, 2006.

BLASCO F.; IOBBI C.; RATOUCHEV, J.; BONNEFOY V.; CHIPPAUX M. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJ* operon. **Mol. Gen. Genet.**, Marseille, v. 222, n. 1, p. 104-111, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa nacional de sanidade avícola. Instrução Normativa 78. **Diário Oficial da União**. Republica Federativa do Brasil. Brasília, 5 nov. Secretaria de Defesa Agropecuária., edição número 215 de 05/11/2003.

BRANDT, U. Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone – oxidoreductase (Complex I) through redox-gated ligand conduction. **Biochim. Biophys. Acta.**, Frankfurt am Main, v. 1318, n. 1-2, p. 79-91, 1997.

BRENNER, F.; VILLAR, R.; ANGULO, F.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **J. Clin. Microbiol.**, Atlanta, v. 38. n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BRINDLEY, A. A., RAUX E.; LEECH, H.K.; SCHUBERT, H. L.; WARREN M. J. Identification and characterization of a small 13–15-kda "ancestral" cobaltochelatase (cbix^s) in the archaea. **J. Biol. Chem.**, London, v. 278, n. 25, p. 22388–22395, 2003.

BRISSETTE, J. L.; RUSSEL, M.; WEINER, L.; MODEL, P. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, New York, v. 87, n. 3, p. 862–866, 1990.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. Biology of microorganisms. PRENTICE-HALL INTERNATIONAL (Ed.). New Jersey, 1988, p. 572-631.

BRUNE, K.; LEFFELL M. S.; SPITZNAGEL, J. K. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocytes. **Infect. Immun.**, Charlotte, v. 5, n. 3, p. 283–287, 1972.

BUCHMEIER, N. A.; HEFFRON, F. Intracellular survival of wild-type *Salmonella* Typhimurium and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. **Infect Immun.**, La Jolla, v.57, p. 1-7, 1989.

BYRD, J. A.; DELOACH, J. R.; CORRIER, D. E.; NISBET, D. J.; STANKER, L. H. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. **Avian Dis.**, Minneapolis, v. 43, n. 1, p. 39-47, 1999.

CANO, D. A.; PUCCIARELLI, M. G.; MARTINEZ-MOYA, M.; CASADESUS, J.; GARCIA-DEL PORTILLO, F. Selection of small-colony variants of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. **Infect. Immun.**, Madrid, v. 71, p. 3690-3698, 2003.

CARTER, P.; COLLINS, F. The route of enteric infection in normal mice. **J. Exp. Med.**, New York, v.139, n. 5, p.1189–1203, 1974.

CECCHINI, G.; ACKRELL, B. A. C.; DESHLER, J. O.; GUNSALUS, R. P. Reconstitution of quinone reduction and characterization of *Escherichia coli* fumarate reductase activity. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v. 261, n. 4, p. 1808-1814, 1986.

CHÉNEBY, D.; HALLET, S.; MONDON, M.; MARTIN-LAURENT, F.; GERMON, J. C.; PHILIPPOT, L. Genetic characterization of the nitrate reducing community based on narG nucleotide sequence analysis. **Microb. Ecol.**, Dijon Cedex, v. 46, n. 1, p. 113–121, 2003.

CHRISTENSEN, J.; BAGGESEN, D. L.; NIELSEN, B.; STRYHN, H. Herd prevalence of *Salmonella* spp. in danish pig herds after implementation of the danish *Salmonella* control program with reference to a pre-implementation study. **Vet. Microbiol.**, Copenhagen, v. 88, n. 2, p. 175–188, 2002.

CLARK, D. P. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Rev.**, Carbondale, v. 63, n. 3, p. 223–234, 1989.

COHEN-BEN-LULU, G. N.; FRANCIS, N. R.; SHIMONI, E.; NOY, D.; DAVIDOV, Y.; PRASAD, K.; SAGI, Y.; CECCHINI, G.; JOHNSTONE, R. M.; EISENBACH, M. The bacterial flagellar switch complex is getting more complex. **EMBO J.**, Rehovot, v. 27, n. 7, p. 1134-44, 2008.

COLE, S. T.; CONDON, C.; LEMIRE, B. D.; WEINER, J. Biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase: a complex membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme of *Escherichia coli*. **Biochim. Biophys. Acta.**, Lausanne, v. 811, n. 4, p. 381-403, 1986.

CONTRERAS, I.; TORO, C.; TRONCOSO, C.; MORA, G. *Salmonella* Typhi mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. **Microbiol.**, Santiago de Chile, v. 143, n. 8, p. 2665–2672, 1997.

COOK, A. J. C.; MILLER, A. Risk factors for a positive meat juice ELISA result an analysis of routine data from Britain. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK. Los Angeles, 2005, p. 24–26.

COOPER, G. L. Salmonellosis infection in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines—a review. **Vet. Bull.**, Addlestone, v. 64, p. 123–143, 1994.

CORKER, H.; POOLE, R. K. Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. **J. Biol. Chem.**, Western Bank, v. 278, n. 34, p. 31584– 31592, 2003.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; MAULDIN, J. M.; BLANKENSHIP, L. C. Presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. **Poult. Sci.**, Athens, v. 69, n. 9, p. 1606–1609, 1990.

CRAWFORD, M. J.; GOLDBERG, D. E. Role for the *Salmonella* flavohemoglobin in protection from nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, St. Louis, v. 273, n. 51, p. 12543–12547, 1998.

CROFT, M. T.; LAWRENCE, A. D.; RAUX-DEERY, E.; WARREN, M. J.; SMITH, A. G. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. **Nat.**, Cambridge, v. 438, n. 7064, p. 90–93, 2005.

CRUZ-RAMOS, H.; CRACK, J.; WU, G.; HUGHES, M. N.; SCOTT, C.; THOMSON, A. J.; GREEN, J.; POOLE, R.K. NO sensing by FNR: regulation of the Escherichia coli NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. **EMBO. J.**, Sheffield, v. 21, n. 13, p. 3235-3244, 2002.

DARUWALA, R.; MEGANATHAN, R. Dimethyl sulfoxide reductase is not required for trimethylamine N-oxide reduction in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Dekalb, v. 67, n. 3, p. 255-260, 1991.

DIBB-FULLER, M. P.; WOODWARD, M. J. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella enteritidis* to colonization and invasion of chicks. **Avian Pathol.**, Addlestone, v. 29, p. 295– 304, 2000.

DICKEL, E. UTILIZAÇÃO DA MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL, REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) NO MONITORAMENTO DE SALMONELLA EM CARCAÇAS DE FRANGO PARA O CONTROLE HIGIÊNICO-SANITÁRIO DO PROCESSO DE ABATE. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DIETERT, R. R.; GOLEMBOSKI, K. A. Avian macrophage metabolism. **Poult. Sci.**, New York, v. 77, n. 7, p. 990-997, 1998.

DIRITA, V.; MEKALANOS, J. Genetic regulation of bacterial virulence. **Annu Rev. Genetic.**, Boston, v. 23, p. 455-482, 1989.

EISENBACH, M. Bacterial flagellar motor. **Curr. Biol.**, Cambridge, v. 18, n. 16, p. 689-691, 1990.

ESCALANTE-SEMERENA, J. Conversion of cobinamide into denosylcobamide in bacteria and archaea. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 189, n. 13, p. 4555–4560, 2007.

ESCALANTE-SEMERENA, J.; JOHNSON, M. G.; ROTH, J. R. The CobII and CobIII regions of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic operon of *Salmonella* Typhimurium. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 174, n. 1, p. 24-29, 1992.

ESCALANTE-SEMERENA, J.; ROTH, J. Regulation of Cobalamin Biosynthetic Operons in *Salmonella* Typhimurium. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 169, n. 5, p. 2251-2258, 1987.

ESCALANTE-SEMERENA, J.; SUH S. J.; ROTH, J. R. *CobA* function is required for both de novo cobalamin biosynthesis and assimilation of exogenous corrinoids in *Salmonella* Typhimurium. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 172, n. 13, p. 273-280, 1990.

ESCHENMOSER, A. Vitamin B₁₂: experiments concerning the origin of its molecular structure. **Chem. Int.**, La Jolla, v. 27, p. 5-39, 1988.

ERNST, R.; DOMBROSKI, D.; MERRICK, J. Anaerobiosis, type I fimbriae and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella* Typhimurium. **Infect. Immun.**, Buffalo, v 58, n. 6, p. 2014-2016, 1990.

EUZEBY, J. P. *Salmonella* nomenclature. **J. Syst. Bacteriol.**, Toulouse Cedex, v. 49, p. 927-930, 1999.

FALKOW, S.; ISBERG, R.; PORTNOY, D. The interaction of bacteria with mammalian cells. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, Stanford, v. 8, p. 333-363, 1992.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat. Rev. Microbiol.**, Washington, v. 2, n. 10, p. 820–832, 2004.

FELL, D. Understanding the control of Metabolism. In: PORTLAND PRESS (Ed.). London and Miami, 1997, p. 57.

FERRIS, K.; AALSBURG, M.; PALMER, T.; HOSTETLER, M. Serotypes from animals and related sources reported during 2002-2003. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION. San Diego, 2003, p. 463-469.

FIELDS, P. I.; SWANSON, R. V.; HAIDARIS, C. G.; HEFFRON, F. Mutants of *S. Typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, La Jolla, v. 83, n. 14, p. 5189–5193, 1986.

FIERER, J.; GUINEY, D. G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **J. Clin. Invest.**, Paris, v. 107, n. 7, p. 775–780, 2001.

FIGUEROA, I.; VERDUGO, A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Rev. Lat. Microbiol.**, Ciudad de México, v. 47, n. 1-2, p. 25 – 42, 2005.

FINK, R.; EVANS, M.; PORWOLLIK, S.; VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; TROXELL, B.; HASSAN, H. FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.**, Raleigh, v. 189, n. 6, p. 2262–2273, 2007.

FINLAY, B.; FALKOW, S. *Salmonella* as an intracellular parasite. **Mol. Microbiol.**, Vancouver, v. 3, n. 12, p. 1833-1841, 1989.

FRESQUET, V.; WILLIAMS, L.; RAUSHEL, F. M. Mechanism of cobyrinic acid *a,c*-diamide synthetase from *Salmonella* Typhimurium LT2. **Biochim.**, Texas, v. 43, n. 33, p. 10619-10627, 2004.

FRETER, R.; O'BRIEN, P. C.; MACSAI, M. S. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with the intestinal mucosa: *in vivo* studies. **Infect. Immun.**, Ann Arbor, v. 34, p. 234– 240, 1981.

FRIEDMAN, A.; BARSHIRA, E.; SKALAN, D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **J. World Poult. Sci.**, Ithaca, v. 59, p. 209-220, 2003.

GALAN, J.; CURTISS, R. Expression of *Salmonella* Typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. **Infect. Immun.**, St. Louis, v. 58, n. 6, p.1879–1885, 1990.

GARDNER, A. M.; HELMICK, R. A.; GARDNER, P. R. Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Cincinnati, v. 277, n. 10, p. 8172-8177, 2002.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. (Ed.). **Dis. Poult.** Ames: Iowa. State University Press, 1997, p. 81-122.

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium in chicks. **Poult Sci.**, Athens, v. 68, n. 11, p. 1454-1460, 1989.

GENNIS, R. B.; STEWART, V. Respiration. In: NEIDHART F. C. (Ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Washington, 1996, p. 217-286.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; SCOTT, A. I. On B₁₂ biosynthesis and evolution. **J. Theor. Biol.**, New Haven, v. 69, n. 2, p. 381-384, 1977.

GILBERTHORPE, N. J.; LEE, M. E.; STEVANIN, T. M.; READ, R. C.; POOLE, R. K. NsrR: a key regulator circumventing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative and nitrosative stress *in vitro* and in IFN- γ -stimulated J774.2 macrophages. **Microbiol.**, Sheffield, v. 153, p. 1756–1771, 2007.

GILBERTHORPE, N.; POOLE, R. Nitric oxide homeostasis in *Salmonella* Typhimurium: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. **J. Biol. Chem.**, Sheffield, v. 283, n. 17, p. 11146-11154, 2008.

GOLDBERG, M. B.; RUBIN, R. H. The spectrum of *Salmonella* infection. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, Boston, v. 2, n. 3, p. 571-98, 1988.

GOMES, C. M.; GIUFFRE, A.; FORTE, E.; VICENTE, J. B.; SARAIVA, L. M.; BRUNORI, M.; TEIXEIRA, M. A novel type of nitric-oxide reductase. *Escherichia coli* flavorubredoxin. **J. Biol. Chem.**, Oeiras, v. 277, n. 28, p. 25273- 25276, 2002.

GORHAM, S. L.; KADAVIL, K.; LAMBERT, H.; VAUGHAN, E.; PERT, B.; ABEL, J. Persistence of *Salmonella* enteritidis in young chickens. **Avian Pathol.**, v. 20, p. 433–437, 1991.

GOTTSCHALK, G. Bacterial Metabolism. In: SPRINGER (Ed.), New York, 1986, p. 182–196.

GREENWOOD, P. S.; NIKULIN, M. S. In: WILEY, J. (Ed). A Guide to Chi-Squared Testing. New York, p. 280, 1996.

GROISMAN, E. A.; SAIER, M. H. *Salmonella* virulence: new clues of intramacrophage survival. **Trends. Biochem. Sci.**, San Diego, v. 15, n. 1, p. 30-33, 1990.

GUEST, J. The Leeuwenhoek Lecture. Adaptation to life without oxygen. **Philos Trans R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, Sheffield, v. 350, n. 1332, p. 189-202, 1995.

HADDOCK, B. A.; JONES, C. Bacterial respiration. **Rev. Bacteriol.**, Leicester, v. 41, p. 47-99, 1977.

HÄRTIG, E.; SCHIEK, U.; VOLLACK, C; ZUMFT, W. G. Nitrate and nitrite of respiratory reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Karlsruhe, v. 181, n. 12, p. 3658-3665, 1999.

HASSAN, J. O.; CURTISS, R. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent *Salmonella* Typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. **Infect Immun.**, Washington, v. 62, n.12, p. 5519-5527, 1994

HENDERSON, C.; BOUNOUS, D.; LEE, M. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infect. Immun.**, Georgia., v. 67. n. 7, p. 3580-3586, 1999.

HEINZINGER, N.; FUGIMOTO, M.; CLARK, M.; MORENO, M.; BARRETT, E. Sequence analysis of the *phs* operon in *Salmonella* Typhimurium and the contribution of thiosulfate reduction to anaerobic energy metabolism. **J. Bacteriol.**, San Diego, v. 172, n. 10, p. 2813-2820, 1995.

HINTON, M.; MEAD, G. C.; IMPEY, C. S. Protection of chicks against environmental challenge with *Salmonella enteritidis* by 'competitive exclusion' and acid-treated feed. **Appl. Microbiol.**, Landord, v. 12, p. 69-71, 1991.

HUGHES, L.; SHOPLAND, S.; WIGLEY, P.; BRADON, H.; LEATHERBARROW, H.; WILLIAMS, N.; CHANTREY, J. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in Northern England from 2005 – 2006. **BMC Vet. Res.**, London, v. 4, n. 4, p. 1-10, 2008.

INGLEDEW, W.; POOLE, R. The respiratory chains of *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.**, Louvain-la-Neuve, v. 48, n. 12, p. 222-271, 1984.

IUCHI, S.; COLE, S. T.; LIN, E. Multiple regulatory elements for the *glpA* operon encoding anaerobic glycerol-3 phosphate dehydrogenase and the *glpD* operon encoding aerobic glycerol-3 phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: further characterization of respiratory control. **J. Bacteriol.**, Boston, v. 172, n. 1, p. 179-184, 1990.

IVERSON, T. M.; LUNA-CHAVEZ, C. L.; CECCHINI, G.; REES, D. C. Structure of the *Escherichia Coli* Fumarate Reductase Respiratory Complex. **Sci.**, San Francisco, v. 284, n. 1, p. 1961-1966, 1999.

JACOB, J. P.; BUTCHER, G. D.; MATHER, F. B. Eye Disorders of Poultry. **Dairy Poultry Sci.**, Gainesville, PS37, 1998.

JETER, R. M.; OLIVERA, B. M.; ROTH, J. R. *Salmonella* Typhimurium synthesizes cobalamin (vitamin B₁₂) de novo under anaerobic growth conditions. **J. Bacteriol.**, Utah, v. 159, n. 1, p. 206-213, 1984.

JI, X. B.; HOLLOCHER, T. C. Reduction of nitrite to nitric oxide by enteric bacteria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Waltham, v. 157, n. 1, p. 106-108, 1988.

JONES, B. D.; FALKOW, S. Identification and characterization of a *Salmonella* Typhimurium oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. **Infect. Immun.**, Stanford, v. 62, n. 9, p.3745–3752, 1994.

JONES, C. J.; AIZAWA, S. The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. **Adv. Microb. Physiol.**, Ibaraki, v. 32, p. 109-172, 1991.

JONES, H. M.; GUNSALUS R. P. Transcription of the *Escherichia coli* fumarate reductase genes (fnrABCD) and their coordinate regulation by oxygen, nitrate and fumarate. **J. Bacteriol.**, Los Angeles, v. 164, n. 3, p. 1100-1109, 1985.

JONES, H. M.; GUNSALUS, R. P. Regulation of *Escherichia coli* fumarate reductase (frdABCD) operon expression by respiratory electron acceptor and the *fnr* gene product. **J. Bacteriol.**, Pittsburgh, v. 169, n. 1, p. 3340-3349, 1987.

JONES, S.; CHOWDHURY, F.; FABICH A.; ANDERSON, A.; SCHREINER, D.; AUTIERI, S.; LEATHAM, M.; LINS, J.; JORGENSEN, M.; COHEN, P.; CONWAY, T. Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. **Infect. Immun.**, Rhode Island, v. 75, n. 10, p. 4891–4899, 2007.

JURTSHUK, P. Bacterial Metabolism. In: BARON (Ed.). Medical microbiology. New York, 1999, cap. 4, p. 345.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokines expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella*. **Microbiol.**, Berkshire, v. 146, p. 3217-3226, 2000.

KAUFMANN, S.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes Infect.**, Paris, v. 3, p. 1177-1181, 2001.

KLEEREBEZEM, M.; CRIELAARD, W.; TOMMASSEN, J. Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. **J. EMBO.**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 162–171, 1996.

KOHBATA, S.; YOKOYAMA, H.; YABUUCHI, E. Cytopathogenic effect of *Salmonella* Typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. **Microbiol. Immun.**, Gifu City, v. 30, n. 12, p. 1225-1237, 1986.

KRAEHENBUHL, J. P.; NEUTRA, M. R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. **Physiol. Rev.**, Epalinges, v. 72, n. 4, p. 853–879, 1992.

KRÖGER A. Nobel prizes for medicine and chemistry. Nobel prize for chemistry: energy transfer during electron transfer phosphorylation. **Fortschr. Med.**, Berlin, v. 96, n. 47-48, p. 2362-2363, 1978.

KWAN, H. S.; BARRETT, E. L. Roles for menaquinone and the two trimethylamine oxide (TMAO) reductases in TMAO respiration in *Salmonella* Typhimurium: Mu d (Apr lac) insertion mutations in men and tor. **J. Bacteriol.**, Los Angeles, v. 155, n. 3, p. 1147-55, 1983.

LANCASTER, C.; GROSS, R.; HAAS, A.; RITTER, M.; MÄNTELE, W.; SIMON, J.; KRÖGER, A. Essential role of Glu C66 for menaquinol oxidation indicates transmembrane electrochemical potential generation by *Wolinella succinogenes* fumarate reductase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Frankfurt, v. 97, p.13051–13056, 2000.

LANGMAN, R. E.; COHN, M. A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system: the consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit. **Res. Immunol.**, San Diego, v. 144, n. 6-7, p. 422-426, 1993.

LEE, C.; FALKOW, S. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Stanford, v. 87, n. 11, p. 4304–4308, 1990.

LEE, C.; BRADLEY D.; FALKOW, S. Identification of a *Salmonella* Typhimurium invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Stanford, v. 89, n. 1, p. 1847-1851, 1992.

LE MINOR, L.; BALOWS, A.; TRÜPER H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. The genus *Salmonella* in the prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification. **Ann Microbiol.**, New York, p. 2760-2774, 1992.

LE MINOR, L; POPOFF, M. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom. rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Paris, v. 37, p. 465-468, 1987.

LENHINGER, D. Principles of Biochemistry. SARVIER (Ed.). New York, 2006.

LESTER, R.; DEMOSS, J. Effects molybdate and selenite on formate and nitrate metabolism in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Lexington, v. 155, n. 3, p. 1006-1014, 1971.

LEUNG, K. Y.; FINLAY, B. B. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Vancouver, v. 88. p. 11470-11474, 1991.

LI, J.; KUSTÚ, S.; STEWART, V. *In vitro* interaction of nitrate responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*; *nark* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. **J. Mol. Biol.**, New York, v. 241, n. 2, p. 150-165, 1994.

LIN, E.; KURITZKES, D. Pathways for anaerobic electron transport. In: NEIDHARDT (Ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: cellular and molecular biology. Washington, p. 201-221, 1987.

LISTER, A. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. **Vet. Rec.**, London, v. 123, n. 1-13, p. 350, 1988.

MACY, J.; KULLA, H.; GOTTSCHALK, G. Hydrogen-dependent growth of *Escherichia coli* on L-malate: succinate formation. **J. Bacteriol.**, Gottingen, v. 125, n. 2, p. 423-428, 1976.

MACY, J.; PROBST, I.; GOTTSCHALK, G. Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5'-triphosphate synthesis by *Bacteroides fragilis* grown in the presence of hemin. **J. Bacteriol.**, Gottingen, v. 123, n. 2, p. 436-442, 1975.

MAGGIO-HALL, L. A.; CLAAS, K. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. The last step in coenzyme B₁₂ synthesis is localized to the cell membrane in bacteria and archaea. **Microbiol.**, Madison, v. 150, p. 1385-1395, 2004.

MAGGIO-HALL, L. A.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. *In vitro* synthesis of the nucleotide loop of adenosylcobalamin by *Salmonella* Typhimurium enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Madison, v. 96, p. 11798–11803, 1999.

MAHAN, M. J.; SLAUCH, J. M.; MEKALANOS, J. J. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. **Sci.**, v. 259, p. 686-688, 1993.

MARTENS, J. H.; BARG, H.; WARREN, M. J.; JAHN, D. Microbial production of vitamin B₁₂. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 58, n. 3, p. 275–285, 2002.

MARTINEZ-MOYA, M.; DE PEDRO, M.; SCHWARZ, H.; GARCIA-DEL PORTILLO, F. Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. **Res. Microbiol.**, Madrid, v. 149, n. 5, p. 309–318, 1998.

MASTROENI, P.; SHEPPARD, M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. **Microbes Infect.**, Madingley Road, v. 6, n. 4, p.398–405, 2004.

MATSUZAKI, M.; KUBOTA, K.; SATOH, T.; KUNUGI, M.; BAN, S.; IMURA, S. Dimethyl sulfoxide-respiring bacteria in Suribati lagoon, a hypersaline lake, in Antarctica and the marine environment. **Polar Biosci.**, Tsukuba, v. 20, p. 73–81, 2006.

MC MULLIN, P. Controle de Salmonelose Aviária: Experiência europeia e as novas directrizes. In: ENCONTRO MERCOLAB DE AVICULTURA 3., 2004, Cascavel. Anais... Cascavel: Meroclab, 2004, p. 13-16.

MEAD, G. C.; IMPEY, C. S. The present status of the nurmi concept for reducing carriage of food-poisoning *salmonellae* and other pathogens in live poultry. In: SMULDERS (Ed.). **Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry.** Amsterdam, 1987, p. 57–76.

MEKALANOS J. J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. **J. Bacteriol.**, Boston, v.174, n. 1, p. 1-7, 1992.

MILLER, S.; PEGUES, D.; MANDELL, G.; BENNETT, J.; DOLIN, R.; MANDELL, D. Salmonella species, including *Salmonella* Typhi. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Ed.). **Principles and practice of infectious diseases**, Philadelphia, 2000, p. 2344-2363.

MILLS, P. C.; RICHARDSON, D. J.; HINTON, J. C. D.; SPIRO, S. Detoxification of nitric oxide by the flavohaemolysin of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Biochem. Soc. Transact.**, Atlanta, v. 33, n. 1, p. 198 -199, 2005.

MILLS, P. C.; ROWLEY, G.; SPIRO, S.; HINTON, J. C.; RICHARDSON, D. J. A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavohaemolysin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. **Microbiol.**, Norwich, v. 154, n. 4, p. 1218-1228, 2008.

MITTRUCKER, H. W.; KAUFMANN, S. H. Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. **J. Leukoc Biol.**, Berlin, v. 67, n. 4, p. 457-463, 2000.

MODEL, P.; JOVANOVIĆ, G.; DWORKIN, J. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. **Mol. Microbiol.**, New York, v. 24, n. 2, p. 255–261, 1997.

MOORS, M. A.; PORTNOY, D. A. Identification of bacterial genes that contribute to survival and growth in an intracellular environment. **Trends. Microbiol.**, Philadelphia., v. 3, p. 83-85, 1995.

MORENO-VIVIÁN, C.; CABELLO, P.; MARTÍNEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **J. Bacteriol.**, Córdoba, v. 181, n. 21, p. 6573–6584, 1999.

NAKAMURA, K.; ABE, F. Ocular lesions in chickens inoculated with *Escherichia coli*. **Can. J. Vet. Res.**, Gifu, v. 51, p. 528-30, 1987.

NEUBAUER, H.; GOTZ, F. Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. **J. Bacteriol.**, Tubingen, v. 178, n. 7, p. 2005–2009, 1996.

NOGUCHI, S.; NISHIMURA, Y.; HIROTA, Y.; NISHIMURA, S. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA. **J. Biol. Chem.**, Suita City, v. 257, n. 11, p. 6544–6550, 1982.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annu. Rev. Med.**, Washington, v. 52, p. 259-274, 2001.

O'TOOLE, G. A.; RONDON, M. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Analysis of mutants of *Salmonella* Typhimurium defective in the synthesis of the nucleotide loop of cobalamin. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 175, n. 11, p. 3317–3326, 1993.

OZAWA, A.; GOTO, J.; ITO, Y.; SHIBATA, H. Histopathological and biochemical responses of germfree and conventional mice with *Salmonella* infection. In: HENEGHAN, J. (Ed). Germfree research: biological effect of gnotobiotic environments. Academic Press, New York, 1973, p. 325–330.

PAYNE, W. J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. **Bacteriol. Rev.**, Atlanta, v. 37, p. 409-452, 1973.

PAULIN, S.; WATSON, P.; BENMORE, A.; STEVENS, M.; JONES, P.; VILLARREAL-RAMOS, B.; WALLIS, T. 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*. **Infect. Immun.**, Berkshire, v. 70, n. 12, p. 6788-6797, 2002.

PAWARIA, S.; RAJAMOCHAN, G.; GAMBHIR, V.; LAMA, A.; VARSHNEY, G. C.; DIKSHIT, K. L. Intracellular growth and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium carrying truncated hemoglobins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microb. Pathol.**, Chandigarh, v. 42, n. 4, p. 119-128, 2007.

PHILIPPOT, L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. **Biochim. Biophys. Acta.**, Dijon Cedex, v. 1577, n. 3, p. 355– 376, 2002.

PHILIPPOT, L.; MIRLEAU, P.; MAZURIER, S.; SIBLOT, S. HARTMANN, A. LEMANCEAU, P.; GERMON, J. C. Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the nar, nir, nor and nos genes. **Biochim. Biophys. Acta.**, Dijon Cedex, v. 1517, p. 436-440, 2001.

PLYM, F. L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: A significant challenge to the global marketing of animal food products. **Rev. Sci. Tech.**, Uppsala, v. 25, n. 2, p. 541–554, 2006.

POPOFF, M.; BOCKEMUHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.**, Paris, v. 147, n. 39, p.765-769, 1996.

POOLE, R. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. **Biochem. Soc. Trans.**, Sheffield, v. 33, p, 176-180, 2005.

POOLE, R.; INGLEDEW, W. Pathways of electrons to oxygen. In: NEIDHARDT (Ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: Cellular and Molecular Biology, Washington, p. 170-200, 1987.

POSPISCHIL, A.; WOOD, R. L.; ANDERSON, T. D. Peroxidase-antiperoxidase and immunogold labeling of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella choleraesuis* var *kunzendorf* in tissues of experimentally infected swine. **Am. J. Vet. Res.**, Ames, v. 51, p. 619-624, 1990.

POWELL, P. C. Immune mechanisms in infections of poultry. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Houghton, v. 15, p. 87-113, 1987.

PRICE-CARTER, M.; TINGEY, J.; BOBIK, T.; ROTH, J. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B₁₂-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. **J. Bacteriol.**, Florida, v. 183, n. 8, p. 2463-2475, 2001.

PULLAN, S. T.; GIDLEY, M. D.; JONES, R. A.; BARRETT, J.; STEVANIN, T. M.; READ, R. C.; GREEN, J.; POOLE, R. K. Nitric oxide in chemostat-cultured *Escherichia coli* is sensed by Fnr and other global regulators: unaltered methionine biosynthesis indicates lack of S nitrosation. **J Bacteriol.**, Sheffield, v. 189, n. 5, p. 1845-1855, 2007.

RAUX, E.; LANOIS, A.; LEVILLAYER, F.; WARREN, M. J.; BRODY, E.; RAMBACH, A.; THERMES, C. *Salmonella* Typhimurium cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes: Functional studies in *S. Typhimurium* and *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Gif sur Yvette, v. 178, n. 3, p. 753- 767, 1996.

RAVCHEEV, D.; GERASIMOVA, A.; MIRONOV, A.; GELFAND, M. Comparative genomic analysis of regulation of anaerobic respiration in ten genomes from three families of gamma-proteobacteria (*Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Vibrionaceae*). **BMC Genom.**, Moscow, p. 1-17, 2007.

REDDY, C. A.; PECK, H. D. Electron transport phosphorylation coupled to fumarate reduction by H₂- and Mg²⁺-dependent adenosine triphosphatase activity in extracts of the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. **J. Bacteriol.**, Athens, v. 134, n. 3, p. 982-991, 1978.

REEVES, M.; EVINS, G.; HEIBA, A.; PLIKAYTIS, B.; FARMER J. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic related ness to other *Salmonella* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* com.nov. **J. Clin. Microbiol.**, Georgia, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.

RICHARDSON, D. J.; KING, G. F.; KELLY, D. K.; MCEWAN, A. G.; FERGUSON, S. J.; JACKSON J. B. The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. **Arch. Microbiol.**, Birmingham, v. 150, p. 131–137, 1988.

RODIONOV, D. A.; VITRESCHAK, A. G.; MIRONOV, A. A.; GELFAND, M. S. Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. **J. Biol. Chem.**, Moscow, v. 278, p. 41148–41159, 2003.

ROOF, D. M.; ROTH, J. R. Ethanolamine utilization in *Salmonella Typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Utah, v. 170, n. 9, p. 3855-3863, 1988.

ROTH, J. R.; LAWRENCE, J. G.; BOBIK, T. A. Cobalamin (coenzyme B₁₂): synthesis and biological significance. **Annu. Rev. Microbiol.**, Gif Sur Yvette, v. 50, p. 137-181, 1996.

ROTH, J. R.; LAWRENCE, J. G.; RUBENFIELD, M.; KIEFFER-HIGGINS, S.; CHURCH, G. M. Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella Typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Gif Sur Yvette, v. 175, n. 8, p. 3303–3316, 1993.

RUITENBERG, E. G.; GUINEE, P. A.; KRUYT, B. C.; BERKVENS, J. M. *Salmonella* pathogenesis in germ-free mice: a bacteriological and histological study. **Br. J. Exp. Pathol.**, Bilthoven, v. 52, p.192–196, 1971.

SAMBASIVARAO, D.; WEINER, J. Dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly by use of in vivo complementation. **J. Bacteriol.**, Alberta, v. 173, n. 19, p. 5935-5943, 1991.

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

SANTOS, F.; VERA, J.; VAN DER HEIJDEN, R.; VALDEZ, G.; VOS, W.; SESMA, F.; HUGENHOLTZ, J. The complete coenzyme B₁₂ biosynthesis gene cluster of *Lactobacillus reuteri* CRL1098. **Microbiol.**, Nijmegen, v. 154, p. 81–93, 2008

SAWERS, R.; JAMIESON, D.; HIGGINS, C.; BOXER, D. Characterization and physiological roles of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *Escherichia coli* K12. **Eur. J. Biochem.** Halle, v. 156, p. 265-275, 1986.

SCHIEMANN, D.; SHOPE, S. Anaerobic growth of *Salmonella* Typhimurium results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. **Infect. Immun.**, Bozeman, v. 59, n. 1, p. 437–440, 1991.

SCHNEIDER, Z.; STROINSKI, A. Methylcobamide-dependent reactions. In: SCHNEIDER, Z.; STROINSKI, A. (Ed.). **Comprehensive B₁₂**. Berlin, 1987. p. 259-266.

SHAWN, B. M. D.; BEARSON, J. A.; GUNSALUS, R. Oxygen and nitrate-dependent regulation of dmsABC operon expression in *Escherichia coli*: sites for Fnr and NarL protein interactions. **BMC Microbiol.**, Los Angeles, v. 2, n. 1, p. 13, 2002.

SHILOH, M. U.; MACMICKING, J. D.; NICHOLSON, S.; BRAUSE, J. E.; POTTER, S.; MARINO, M.; FANG, F.; DINAUER, M.; NATHAN, C. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Immunity.**, New York, v. 10, n. 1, p. 29–38, 1999.

SIDDIQUI, R. A.; WARNECKE-EBERZ, U.; HENGESBERGER, A.; SCHNEIDER, B.; KOSTKA, S.; FRIEDRICH, B. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. **J. Bacteriol.**, Berlin, v. 175, n. 18, p. 5867–5876, 1993.

SILVESTRO, A., POMMIER, J.; GIORDANO, G. The inducible trimethylamine *N*-oxide reductase of *Escherichia coli* K-12: biochemical and immunological studies. **Biochem. Biophys. Acta.**, Brescia, v. 954, n. 1, p. 1-13, 1988.

SINGH, D. R.; KHULLAR, M.; GANGULY, N. K. Role of anaerobiosis in virulence of *Salmonella* Typhimurium. **Mol. Cell. Biol.**, Chandigarh, v. 215, p. 39-46, 2000.

SLED, V. D.; LEIF, H.; WEISS, H.; GENNIS, R. B.; OHNISHI, T. Bacterial NADH-quinone oxidoreductase: iron-sulfur clusters and related problems. **J. Bioenerg. Biomembr.**, Philadelphia, v. 25, n. 4, p. 347-355, 1993.

SMITH, J. A. Neutrophils host defense, and inflammations: a double-edged sword. **J. Leukoc Biol.**, Camberra, v. 56, n. 6, p. 672-686, 1994.

SOWDER, J. T.; CHEN, C. L.; AGER, L. L.; CHAN, M. M.; COOPER, M. D. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. **J. Exp. Med.**, Birmingham, v. 167, n. 1, p. 315–322, 1988.

SPIRO, S.; GUEST, J. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. **Trends. Biochem. Sci.**, Sheffield, v. 16, n. 8, p. 310-314, 1991.

STABLER, J. G.; MCCORMICK, T. W.; POWELL, K. C.; KOGUT, M. H. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella* Enteritidis. **Vet. Microbiol.**, Fayetteville, v. 38, p. 293–305, 1994.

STEVANIN, T. M.; POOLE, R. K.; DEMONCHEAUX, E. A.; READ, R. C. Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella* enterica serovar Typhimurium from nitric oxide-related killing by human macrophages. **Infect. Immun.**, Sheffield, v. 70, n. 8, p. 4399-4405, 2002.

STEVANIN, T. M.; READ, R. C.; POOLE, R. K. The hmp gene encoding the NO-inducible flavohaemoglobin in *Escherichia coli* confers a protective advantage in resisting killing within macrophages, but not in vitro: links with swarming motility. **Gen.**, Sheffield, v. 398, n. 1-2, p. 62-68, 2007.

STEWART, V. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. **Microbiol. Rev.**, New York, v. 52, n. 2, p. 190-232, 1988.

STEWART, V. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Ithaca, v. 9, n. 3, p. 423-434, 1993.

STOUTHAMER, A. H. A genetical and biochemical study of chlorate-resistant mutants of *Salmonella* Typhimurium. **J. Microbiol. Serol.**, Amsterdam, v. 35, p. 505-521, 1969.

STROINSKI, A. Adenosylcobamide-dependent reactions. In: SCHNEIDER, Z.; STROINSKI, A. (Ed.). **Comprehensive B12**. Berlin, 1987, p. 226-259.

SUTER, E. Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms. **Bacteriol. Vet.**, Boston, v. 20, n. 2, p. 94-132, 1956.

SUTER, E.; RAMSEIER, H. Cellular reactions in infection. **Adv. Immunol.**, Florida, v. 4, p. 117-167, 1964.

TAKEUCHI, A.; SPRINZ, H.; LABREC, E. H.; FORMAL, S. B. Experimental bacillary dysentery. An electron microscopic study of the response of the intestinal mucosa to bacterial invasion. **Am. J. Pathol.**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1011–1044, 1965.

TARTERA, C.; METCALF, E. Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella* Typhi adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells. **Infect. Immun.**, Philadelphia, v. 61, n. 7, p. 3084–3089, 1993.

TAUXE, R. V. *Salmonella*: a postmodern pathogen. **J. Food Prot.**, Atlanta, v. 54, n. 7, p. 563-568, 1991.

TAYLOR, B. L.; MILLER, J. B.; WARRICK H. M.; KOSHLAND, D. E. Electron acceptor taxis and blue light effect on bacterial chemotaxis. **J. Bacteriol.**, Loma Linda, v. 140, n. 2, p. 567-573, 1979.

TIELENS, A.; VAN HELLEMOND, J. The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. **Biochim. Biophys. Acta.**, Utrecht, v. 1365, n. 1-2, p. 71-78, 1998.

TOPP, R. C.; CARLSON, H. C. Studies on avian heterophils. **Avian. Dis.** Ghelph, v. 16, n. 2, p. 374–380, 1972.

TSENG, C.; HANSEN, A.; COYLER, P.; GUNSALUS, R. Effect of cell growth rate on expression of the anaerobic respiratory pathway operons frdABCD, dmsABC, and narGHJI pathogenicity island 2-dependent expression of suppressor of cytokine signaling 3 in macrophages of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Los Ángeles, v. 176, n. 21, 1994.

TURNER, A.; LOVELL, M.; HULME, S.; ZHANG-BARBER, L.; BARROW, A. Identification of *Salmonella* Typhimurium genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. **Infect. Immun.**, Berkshire, v. 66, n. 5, p. 2099-2106, 1998.

TURNER, A.; ZHANG-BARBER, L.; WIGLEY, P.; MUHAMMAD, S.; JONES, M. A.; LOVELL, M. A.; HULME, S.; BARROW, P. A. Contribution of proton-translocating proteins to virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurim, Gallianarum, and Dublin in chickens and mice. **Infect. Immun.**, Berkshire, v. 71, n. 6, p. 3392-3401, 2003.

UCHIYA, K. I.; NIKAI, T. *Salmonella*. **Infect. Immun.**, Nagoya, v. 73, p. 5587-5594, 2005.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochim. Biophys.**, Becherweg, v.1320, n. 3, p.217–234, 1997.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASEDESUS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enteric*. **Epidemiol. Infect.**, Sassari, v.125, p. 229 -255, 2000.

VAN DER WIELEN, P. W.; BIESTERVELD, S.; NOTERMANS, S.; HOFSTRA, H.; URLINGS B. A. P.; VAN KNAPEN, F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. **Applied. Environmen. Microbiol.**, Utrecht, v. 66, n. 6, p. 2536-2540, 2000

VAN DUIJKEREN, E.; WANNET, W.; HOUWERS, D.; VAN PELT, W. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and

chickens in the Netherlands from 1984 - 2001. **J. Clin. Microbiol.** Utrecht, v. 40, n. 11, p. 3980–3985, 2004.

VAN HELLEMOND, J. J.; TIELENS, A. G. Expression and functional properties of fumarate reductase. **J. Biochem.**, v. 304, p. 321-331, 1994.

VAN IMMENSEEL, F.; MEULEMANS L.; DE BUCK J. Bacteria-host interactions of *Salmonella* paratyphi in poultry. **Epidemiol. Infect.**, Salisbury, v.132, n. 2, p. 239–243, 2004.

VAN IMMENSEEL, 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. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 133, n. 6, p. 959-978, 2005.

VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F. C. Oxygen-dependent anti-*Salmonella* activity of macrophages. **Trends Microbiol.**, Denver, v. 9, p. 29–33, 2001.

VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; MASTROENI, P.; ISCHIROPOULOS, H.; FANG, F. C. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. **J. Exp. Med.**, Denver, v. 192, p. 227–236, 2000a.

VAZQUEZ-TORRES, A.; XU, Y. JONES-CARSON, J.; HOLDEN, D. W.; LUCIA, S. M.; DINAUER, M. C.; MASTROENI, P.; FANG, F. C. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. **Sci.**, Denver, v. 287, n. 5458, p. 1655–1658, 2000b.

WARREN, M. J.; RAUX, E.; SCHUBERT, H. L.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). **Nat. Prod. Rep.**, London, v. 19, n. 4, p. 390-412, 2002.

WEI, Y.; MILLER, C. Characterization of a group of anaerobically induced, *fnr*-dependent genes of *Salmonella* Typhimurium. **J. Bacteriol.**, v. 181, No. 19, p. 6092–6097, 1999.

WEINBERG, J. B. Human mononuclear phagocyte nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression, In: FANG, F. C. (Ed.). **Nitric oxide and infection**. Academic Press, New York, 1999. p. 95-150.

WEINER, J. H.; CAMMACK, R.; COLE, S. T.; CONDON, C.; HONORÉ, N.; LEMIRE, B. D.; SHAW, G. A mutant of *Escherichia coli* fumarate reductase decoupled from electron transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, Edmonton, v. 83, n. 7, p. 2056-2060, 1986.

WEINER, J. H.; MACISAAC, D. P.; BISHOP, R. E.; BILOUS, P. T. Purification and properties of *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase, an iron-sulfur molybdoenzyme with broad substrate specificity. **J. Bacteriol.**, Edmonton, v.170, p. 1505–1510, 1988.

WEINER, J. H., ROTHERY, R. A.; SAMBASIVARAO, D.; TRIEBER, C. A. Molecular analysis of dimethylsulfoxide reductase: a complex iron-sulfur molybdoenzyme of *Escherichia coli*. **Biochim. Biophys. Acta.**, Edmonton, v. 1102, n. 1, p. 1-18, 1992.

WESTENBERG, D. J.; GUNSALUS, R. P.; ACKRELL, B. A.; SICES, H.; CECCHINI, G. *Escherichia coli* fumarate reductase frdC and frdD mutants. Identification of amino acid

residues involved in catalytic activity with quinones. **J. Biol. Chem.**, Los Angeles, v. 268, n. 2, p. 815–822, 1993.

WISSENBACH, U.; KROGER, A.; UNDER, G. The specific functions of menaquinone and dimethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. **Arch. Microbiol.**, Frankfurt, v. 154, p. 60-66, 1990.

WISSENBACH, U.; TERNES, D.; UNDEN, G. An *Escherichia coli* mutant containing only dimethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration. **Arch. Microbiol.**, Frankfurt, v. 158, p. 68-73, 1992

WOOTTON, J.; NICHOLSON, R.; COCK, J.; WALTERS, D.; BURKE, J.; DOYLE, W.; BRAY, R. Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. **Biochim. Biophys. Acta.**, Leeds, v. 1057, p. 157-185, 1991.

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

ZAYAS, C. L.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Reassessment of the late steps of coenzyme b12 synthesis in salmonella enteric: evidence that dephosphorylation of adenosylcobalamin-5'-phosphate by the CobC phosphatase is the last step of the pathway. **J. Bacteriol.**, Madison, v. 189, n. 6, p. 2210-2218, 2007.

ZHANG, S.; ADAMS, L. G.; NUNES, J.; KHARE, S.; TSOLIS R. M.; BAUMLER, A. J. Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-

specific chemokine profiles in animal models of Typhoid fever and enterocolitis. **Infect. Immun.**, Texas, v. 71, n. 8, p. 4795–4803, 2003

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; MARTIN, G.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; BARROW, P. A. Influence of genes encoding proton-translocating enzymes on suppression of *Salmonella* Typhimurium growth and colonization. **J. Bacteriol.**, Berkshire, v. 179, n. 22, p.7186-7190, 1997.