

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR DE AVES COMERCIAIS (*Gallus gallus domesticus*)
DESAFIADAS POR *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella*
Typhimurium CONTENDO DELEÇÃO DOS GENES *ttrA* E
*pduA***

Julia Memrava Cabrera

Zootecnista

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR DE AVES COMERCIAIS (*Gallus gallus domesticus*)
DESAFIADAS POR *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella*
Typhimurium CONTENDO DELEÇÃO DOS GENES *ttrA* E
*pduA***

Discente: Julia Memrava Cabrera

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior

Coorientador: Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2022

C117a

Cabrera, Julia Memrava

Avaliação imunoistoquímica da resposta imune celular de aves comerciais (Gallus gallus domesticus) desafiadas por Salmonella Enteritidis e Salmonella Typhimurium contendo deleção dos genes ttrA e pduA / Julia Memrava Cabrera. -- Jaboticabal, 2022
53 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Mauro de Mesquita Souza Saraiva

1. Linfócitos. 2. Macrófagos. 3. Salmonella Enteritidis. 4. Salmonella Typhimurium. 5. Salmonelose. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

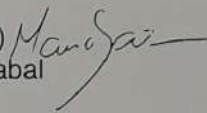
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE AVES COMERCIAIS (*Gallus gallus domesticus*) DESAFIADAS POR *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium CONTENDO DELEÇÃO DOS GENES *ttrA* e *pduA*

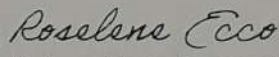
AUTORA: JULIA MEMRAVA CABRERA

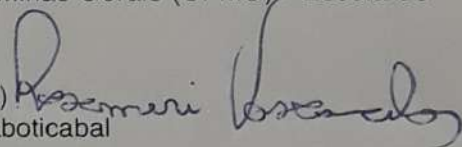
ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORDENADOR: MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Pós-doutorando MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA (Participação Virtual) 
Departamento de Patologia Reproducão e Saúde Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. ROSELENE ECCO (Participação Virtual) 
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Escola de Veterinária

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS (Participação Virtual) 
Departamento de Patologia Reproducão e Saúde Unica / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Julia Memrava Cabrera, São Paulo, 26/07/1991. Possui graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2019). Foi bolsista de Treinamento Técnico nível 3 (TT-3) pela FAPESP, atuando no laboratório de Ornitopatologia do departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV). Atualmente é aluna de mestrado da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Tem experiência na área de Zootecnia, com ênfase em Microbiologia Agropecuária.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosana, por todo amor, dedicação, educação e incentivo. Agradeço por apoiar todas as minhas decisões, sempre ser meu porto seguro e servir de exemplo em todos os âmbitos. Eu nada seria se não fosse você e seu legado em minha vida. Obrigada por ser minha mãe e amiga. Sempre soube que não importa onde eu estiver, sempre terei você comigo.

Aos meus avós, Dirce e Rodolpho, por todo carinho, momentos de ternura e felicidade. Obrigada por não apenas estarem ao meu lado me apoiando em todos os momentos, mas por serem um porto seguro. Minhas lembranças e meu coração estão repletos de dias de felicidade que tivemos juntos.

Ao meu namorado, Daniel Farias Marinho do Monte, um reconhecido incentivador de pessoas. Que sorte a minha que nossos caminhos se cruzaram. Poder ter como companheiro alguém que me incentiva profissionalmente e divide todo o vasto conhecimento diariamente já seria de grande felicidade. Mas os momentos que tivemos, a conexão de partilharmos, definiria como um acontecimento inesperadamente maravilhoso. Obrigada por dividir essa caminhada comigo. Que continue em outras vidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior – um ser humano genuinamente bom e justo-, pela oportunidade, confiança e apoio. Obrigada por possibilitar que eu me encontrasse profissionalmente, nada poderia ser mais importante do que isso. Agradeço também pela troca diária de ensinamentos e boas conversas.

Ao meu coorientador, Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva, que me deu espaço e oportunidade de começar o que desejo que seja minha carreira até o final da vida. Pelas risadas e momentos de leveza.

A toda equipe do Laboratório de Ornitopatologia – Unesp/FCAV, pelas experiências e ensinamentos compartilhados. Obrigada por contribuírem para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, minha gratidão ao

conselho, docentes e todos os funcionários por todo aprendizado e bons momentos durante minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 8888.512107/2020-00, e com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo nº 2018/03189-0.

Ao Houghton Trust, por financiar a apresentação de trabalho internacional derivado desta dissertação em congresso internacional.

Aos membros da banca examinadora que contribuíram substancialmente para melhoria desta dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução.....	1
Revisão de literatura.....	3
Mecanismos de patogenicidade.....	3
Genes <i>ttrA</i> e <i>pduA</i>	3
Sistema imune de aves comerciais.....	7
Imunoistoquímica.....	8
Objetivos.....	8
Objetivo geral.....	8
Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO 2 - <i>Salmonella enterica</i> SEROVARS IN ABSENCE OF <i>ttrA</i> AND <i>pduA</i> GENES ENHANCE THE CELL IMMUNE RESPONSE DURING CHICK INFECTIONS.....	10
Abstract.....	10
Introduction.....	10
Results.....	12
Experiment 1 – <i>Salmonella</i> Enteritidis challenged.....	12

Experiment 2 – <i>Salmonella</i> Typhimurium challenged.....	13
Discussion.....	15
Material and methods.....	17
Bacterial strains and mutant construction.....	18
<i>In vivo</i> experiment.....	18
Experiment 1 – <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	18
Experiment 2 – <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	19
Immunohistochemistry.....	19
Tissue section.....	19
Immune cells staining.....	20
Data analysis.....	21
References.....	22
Tables.....	26
Figure.....	30
Supplementary information.....	31
REFERÊNCIAS.....	37

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE AVES COMERCIAIS (*Gallus gallus domesticus*) DESAFIADAS POR *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium CONTENDO DELEÇÃO DOS GENES *ttrA* E *pduA*

RESUMO - *Salmonella* spp. é um dos principais patógenos de origem alimentar responsável por causar grandes prejuízos econômicos, principalmente para a avicultura, e trazer consequências também para a saúde pública. Tanto a capacidade de sobrevivência do patógeno no ambiente durante a inflamação quanto sua relação com o sistema imunológico do hospedeiro, desempenham um papel fundamental durante as infecções em aves. O objetivo deste estudo foi quantificar a presença de macrófagos e populações de linfócitos T, por meio da utilização da técnica de imuno-histoquímica, em linhagens comerciais de frangos infectados experimentalmente por cepas selvagens e mutantes de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium contendo deleção dos genes *ttrA* e *pduA*. *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA \Delta pduA$ desencadeou uma porcentagem maior da área corada do que o tipo selvagem, com exceção de poedeiras leves. As infecções por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Typhimurium $\Delta ttrA \Delta pduA$ levam a um padrão, 1 e 14 dpi apresentam uma porcentagem da área marcada mais expressiva do que em 3 e 7 dpi. Em ambas as linhagens estudadas, foi observada infiltração proeminente de macrófagos em comparação com os linfócitos. No geral, os animais infectados pela cepa mutante apresentam uma área marcada positivamente maior do que o tipo selvagem. Deleções nos genes *ttrA* e *pduA* resultaram em uma infiltração mais intensa de macrófagos e linfócitos nas aves hospedeiras, sugerindo não atenuação do patógeno, mesmo em diferentes cepas de *Salmonella*.

Palavras-chave: linfócitos, macrófagos, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, salmonelose

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE IMMUNE CELL RESPONSE OF COMMERCIAL BIRDS (*Gallus gallus domesticus*) CHALLENGED BY *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium CONTAINING DELETION OF *ttrA* AND *pduA* GENES

ABSTRACT – *Salmonella* spp. is one of the major foodborne pathogens responsible for causing great economic damage, especially to the poultry industry, and bringing consequences for public health as well. Both the pathogen survival ability in the environment during inflammation as well as their relationship with the host immune system, play a key role during infections in poultry. The objective of this study was to quantify the presence of the macrophages and T lymphocytes populations using the immunohistochemistry technique, in commercial lineages of chickens experimentally infected by wild-type and mutant strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium lacking *ttrA* and *pduA* genes. *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA \Delta pduA$ triggered a higher percentage of the stained area than the wild-type, with exception of light-laying hens. *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Typhimurium $\Delta ttrA \Delta pduA$ infections lead to a pattern, 1 and 14 dpi present a percent of the stained area more expressive than at 3 and 7 dpi. In both lineages studied, were observed prominent infiltration of macrophages in comparison with lymphocytes. Overall, animals infected by the mutant strain display a positively stained area higher than the wild-type. Deletions in both *ttrA* and *pduA* genes resulted in a more intense infiltration of macrophages and lymphocytes in the host birds, suggesting no pathogen attenuation, even in different strains of *Salmonella*.

Keywords: lymphocytes, macrophages, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, salmonellosis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Estrutura das subunidades da enzima tetrionato redutase.....4

Figura 2. Esquema metabolismo de enxofre (S) intestinal.....5

Figura 3. Processos metabólicos relacionados ao processo de exclusão competitiva entre bactéria do gênero *Salmonella* spp. e a microbiota residente no intestino.....6

CAPÍTULO 2 - *Salmonella enterica* SEROVARS IN ABSENCE OF *ttrA* AND *pduA* GENES ENHANCE THE CELL IMMUNE RESPONSE DURING CHICK INFECTIONS

Figure 1. Section of the caecum of broiler infected by *Salmonella* Typhimurium $\Delta ttrA\Delta pduA$ showing immunoreactions in macrophages, 7 days post infection (x400; Avidin-Biotin Streptavidin Peroxidase, counter stained with Hematoxylin).....30

Supplementary Figure S1. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of broiler infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA\Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.....31

Supplementary Figure S2. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of semi-heavy laying hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA\Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.....31

Supplementary Figure S3. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of light laying hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA\Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between

challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.....	32
Supplementary Figure S4. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4 ⁺ and CD8 ⁺ , and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of broiler infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium or <i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta trA \Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.....	33
Supplementary Figure S5. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4 ⁺ and CD8 ⁺ , and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of semi-heavy laying hens infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium or <i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta trA \Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.....	34
Supplementary Figure S6. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4 ⁺ and CD8 ⁺ , and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of light laying hens infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium or <i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta trA \Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.....	35

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - *Salmonella enterica* SEROVARS IN ABSENCE OF *ttrA* AND *pduA* GENES ENHANCE THE CELL IMMUNE RESPONSE DURING CHICK INFECTIONS

Table 1. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of broilers infected with <i>Salmonella</i> Enteritidis wild and mutant strains at different days post-infection	26
Table 2. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of semi-heavy laying hens infected with <i>Salmonella</i> Enteritidis wild and mutant strains at different days post-infection	26
Table 3. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of light laying hens infected with <i>Salmonella</i> Enteritidis wild and mutant strains at different days post-infection	27
Table 4. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of broilers infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium wild and mutant strains at different days post-infection	27
Table 5. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of semi-heavy laying hens infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium wild and mutant strains at different days post-infection	28
Table 6. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of light laying hens infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium wild and mutant strains at different days post-infection	28
Table 7. Established groups according to the different lineages and strains	29

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Introdução

A avicultura comercial é considerada um dos setores de maior crescimento da indústria agropecuária no Brasil. De acordo com dados projetados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), no ano de 2020, a produção brasileira de carne de frango apresentará um crescimento entre 3 e 4%, alcançando o total de 13,7 bilhões de quilos. Este crescimento tem sido observado em ambos os aspectos, exportação e consumo interno, demonstrando que, apesar dos impactos da pandemia, o setor continua altamente produtivo. Outro ponto importante para a eficiência deste desempenho é a evolução da genética das aves, da nutrição e do sistema de manejo. Porém, a intensificação do sistema produtivo adotado na maioria das criações, com alta densidade populacional, favorece a presença de agentes patogênicos nos lotes (ABPA, 2017), em especial estirpes de *Salmonella enterica*.

Surtos alimentares em seres humanos, provenientes de ingestão de produtos de origem avícola, são frequentemente associados a *Salmonella* spp. (O'Regan et al., 2008), visto que estes são animais suscetíveis e podem atuar como fonte de infecção para disseminação do patógeno (Omiccioli et al., 2009). O gênero *Salmonella* integra a família Enterobacteriaceae, e abriga mais de 2600 sorovares (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014), muitos deles altamente virulentos, sendo a maioria considerada patogênica para os seres humanos e animais. No caso das aves, ocorrem três tipos de infecções: o tifo aviário, causado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*); a pulorose, causada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*); o paratifo aviário, sem agente etiológico específico, e pode ser causado por qualquer um dos demais sorovares (ex.: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares Enteritidis (*S. Enteritidis*), Heidelberg (*S. Heidelberg*) e Typhimurium (*S. Typhimurium*)).

Infecções ou surtos provocados por salmoneloses devem ser, obrigatoriamente, notificadas à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), em decorrência aos prejuízos causados pela mortalidade de animais e além de apresentarem risco de disseminação da doença para outras localidades (OIE, 2012), uma vez que a salmonelose é considerada uma doença transmitida por alimentos (DTA) de ocorrência global. Em países industrializados, a incidência

de DTAs causadas por sorovares paratíficos do gênero *Salmonella*, é frequentemente alta em levantamentos epidemiológicos (Ma et al. 2014). No Brasil, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) (2020), em seu último relatório publicado referente ao período 2007-2015, embora a incidência de DTAs no país tenha apresentado queda durante os anos, o principal patógeno isolado dentre as amostras analisadas foram estirpes do gênero *Salmonella*, (25,17%), no qual, *Salmonella* Enteritidis foi responsável por 67,5% destes.

Os sorovares *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, há décadas, são associados principalmente a infecções alimentares. Entre 1995 e 2010, *S. Enteritidis* foi identificada em 34,2% do total de amostras positivas para *Salmonella* spp. (Freitas Neto et al., 2010). Conforme o sistema de alerta rápido da União Europeia (RASFF), no ano de 2017, em 330 lotes de carne de frango provenientes do Brasil detectou-se *Salmonella* spp. em 299 deles, resultando em rejeite e devolução da remessa ao país de origem. Esta notificação e estorno de produtos avícolas demonstrou um ponto crítico para o mercado exportador brasileiro, pois podem resultar em embargos comerciais, causando maior prejuízo econômico ao país (EU, 2017).

A escolha por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium se deve, não apenas ao histórico como causadores de infecções alimentares oriundas de produtos de origem avícola, mas também aos embargos comerciais e grande prejuízo à economia do país causado por estas estirpes. Essas salmonelas nem sempre provocam grandes danos à saúde das aves, mas quando presentes se constituem em problema de saúde pública e deve-se mencionar a facilidade para se tornarem multirresistente à antimicrobianos, bem como se perpetuarem no ambiente. No meio científico, estudos que avaliam o metabolismo bacteriano têm se destacado, assim como os fatores associados ao processo de colonização em mamíferos. Porém, ainda há escassez de estudos que avaliem especificamente as vias do metabolismo de *Salmonella* spp. em aves. Compreender a atuação dos genes responsáveis por essas vias, que proporcionam vantagem à colonização e multiplicação bacteriana em aves comerciais, evidencia a importância deste estudo. E a disponibilidade de ferramentas como a imuno-histoquímica contribuem para a compreensão de como o hospedeiro responde à infecção. Os conhecimentos adquiridos poderão ajudar a compreender melhor a relação da bactéria com o hospedeiro, assim auxiliando na busca de alternativas para inibir sua sobrevivência em aves e permanência no ambiente avícola.

Revisão de literatura

Mecanismos de patogenicidade

Diversos fatores estão envolvidos no desenvolvimento da patogenia de *Salmonella* spp., tais como: o epitélio intestinal, a interação com o organismo do hospedeiro, a alta capacidade de invasão, a sobrevivência intracelular em macrófagos infectados e a evasão da resposta imune (Soria et al., 2013).

O epitélio da mucosa intestinal contém várias barreiras que impedem ou bloqueiam a infecção por bactérias para manter sua integridade e limitar os danos associados à inflamação residente (Patel; McCormick, 2014). Em infecções ocasionadas por salmonelas paratíficas, com a finalidade de garantir a colonização e multiplicação, o epitélio têm suas barreiras invadidas ocasionando uma resposta inflamatória e imune (Van Immerseel et al., 2002). Esta resposta inflamatória é resultado da interação bacteriana com células hospedeiras, incluindo células epiteliais e células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas.

A inflamação intestinal, em aves domésticas, é caracterizada pela secreção de várias citocinas, incluindo interleucina IL -23, que por sua vez estimula células T auxiliares, que mantêm a produção de IL-17 na mucosa (Chirullo et al., 2016). De acordo com Pérez (2016), a citocina IL-17 é capaz de preservar a integridade da barreira intestinal, controlando a colonização e translocação bacteriana. Portanto, a capacidade de multiplicação no ambiente mucoso acometido por inflamação depende da aquisição de nutrientes e respiração anaeróbica (Winter, 2010). Entretanto, a disponibilidade de nutrientes não garante a sobrevivência da bactéria em um ambiente competitivo e densamente povoado por outros microrganismos. Desta forma, o invasor deve realizar atividades metabólicas essenciais por meio de ativação de genes que tornem possível a sua sobrevivência (Ernst et al., 1990).

Genes *ttrA* e *pduA*

Em microrganismos pertencentes ao filo *Proteobacteria* e família Enterobacteriaceae, como, *Salmonella* spp., o tetracionato (SO_4^{2-}) é utilizado como aceptor alternativo de elétrons (Winter; Baumber, 2011). Supunha-se que este mecanismo estaria relacionado à sobrevivência da bactéria em estado de vida livre, quando presente em ambientes, como solo ou carcaças em decomposição, contendo o tetracionato (Hensel et al., 1999). Contudo, estudos posteriores

sugerem que houve evolução genética das salmonelas paratíficas, que propiciou a utilização da mucosa intestinal inflamada como ambiente adequado para sua sobrevivência e multiplicação da bactéria (Stecher et al., 2007; Thiennimitr et al., 2011).

A utilização do tetrionato, através da tetrionato redutase, ocorre em condições de escassez de oxigênio. A enzima é constituída por três subunidades (Figura 1): TtrC, que possui 9 hélices transmembranares e pertence à família NrfD, e é envolvido na transferência de dois elétrons do “pool” de quinona (Q) para outros componentes do complexo redutase, enquanto libera dois prótons (H^+) para o periplasma; TtrB, que contém um domínio de ligação ferro-enxofre (FeS), pode ligar o transporte de elétrons entre subunidades e reduz o tetrionato; e TtrA, que também possui um domínio de ligação FeS e pertence à superfamília molibdopterina (MPT), com seu centro ativo diretamente envolvido na redução de tetrionato em tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) (Hinsley; Berks, 2002; Winter; Baumler, 2011).

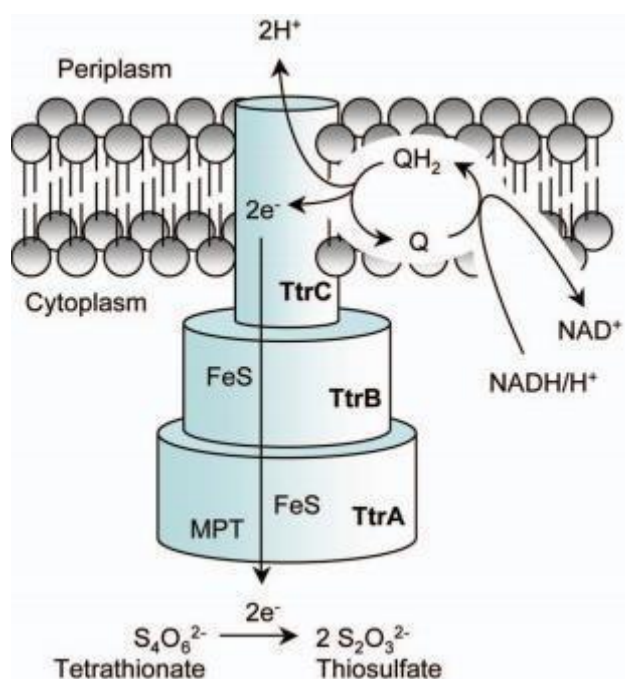


Figura 1. Estrutura das subunidades da enzima tetrionato redutase. (Winter; Baumler, 2011).

A utilização da enzima tetrionato redutase pelo gênero *Salmonella* spp., durante a inflamação da mucosa intestinal, proporciona vantagens metabólicas para competir com a microbiota residente no hospedeiro. Isto ocorre porque o gênero abriga um tipo particular de ilha genômica denominadas ilhas de patogenicidade (SPIs); neste caso específico, ilha dos tipos 1 e 2 (SPI-1 e SPI-2) que permitem a sua invasão e sobrevivência no local. As proteínas efetoras

deste sistema de secreção (tipo III), que são obtidas dentro das células do hospedeiro, irão provocar a produção de citocinas pró-inflamatórias (Khan, 2014). Colônias de bactérias naturais do intestino podem produzir grandes quantidades de sulfeto de hidrogênio (H_2S), composto altamente tóxico, que é convertido em tiosulfato na mucosa intestinal. E, para que o tiosulfato seja utilizado por sorovares de *Salmonella* spp., precisa ser oxidado por iodo a tetrationato (Figura 2).

Esta reação é acompanhada pela migração de neutrófilos para o lúmen do intestino e a produção de radicais de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) – que são prejudiciais à microbiota intestinal e inofensivas às bactérias patogênicas, como as do gênero *Salmonella*. O tetrationato permite que a bactéria respire em um ambiente onde predomina a fermentação, garantindo vantagem competitiva (Winter et al., 2010).

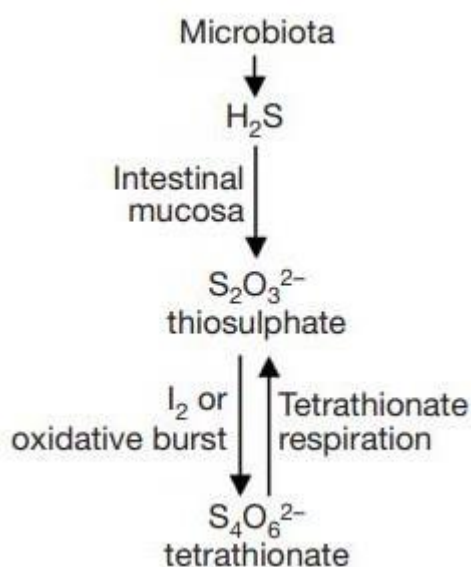


Figura 2. Esquema metabolismo de enxofre (S) intestinal. (Winter et al., 2010).

De acordo com Saxena et al. (2010), algumas bactérias produzem 1,2-propanodiol que, inacessível à microbiota fermentadora do intestino, é utilizado como fonte de energia por *Salmonella* Typhimurium, por intermédio do tetrationato, comoceptor de elétrons em meio a respiração anaeróbica (Thiennimitr et al., 2011). No trato intestinal existem duas fontes de carbono em grandes quantidades, a ramnose e a fucose (Staib; Fuchs, 2015), as quais são fermentadas em ambiente anaeróbico durante o processo de multiplicação bacteriana, resultando em 1,2-propanodiol (Badía et al., 1985). *Salmonella* enterica, é capaz de utilizar este composto

como fonte de carbono por uma via dependente de vitamina B12 sintetizada de forma endógena. O 1,2-propanodiol é utilizado por microcompartimento (MCP) bacteriano, constituído de sete diferentes proteínas, dentre as quais o PduA atua como principal componente estrutural (Staib; Fuchs, 2015). A geração de energia inicia-se com a conversão do 1,2-propanodiol a propionaldeído, que posteriormente será reduzido a propanol e propionato pela propanodiol-desidratase. Este processo gera um ATP por fosforilação, um gradiente de elétrons (1-propanol) para regeneração de NAD e um intermediário (propionil-CoA), que pode servir como fonte de carbono e energia pela via do metilcitrato (Horswill; Escalante-Semerena, 1997).

Outra alternativa para fontes de carbono é a etanolamina, composto orgânico produzido em decorrência da inflamação e descamação intestinal. Portanto, substrato de constante produção durante algumas tentativas de colonização e multiplicação bacteriana nas aves (Gart et al., 2016). A etanolamina é convertida em acetaldeído e amônia pela enzima etanolamina amônia-liase (Garsin et al., 2010). A amônia é utilizada como fonte de nitrogênio e o acetaldeído é transformado em acetil-CoA, sendo utilizado em vários processos metabólicos (Jones; Turner, 1984). Portanto, o tetrationato possui importante função na utilização de etanolamina e 1,2-propanodiol por *Salmonella* spp., em condições de anaerobiose (Figura 3) (Price-Carter et al., 2001).

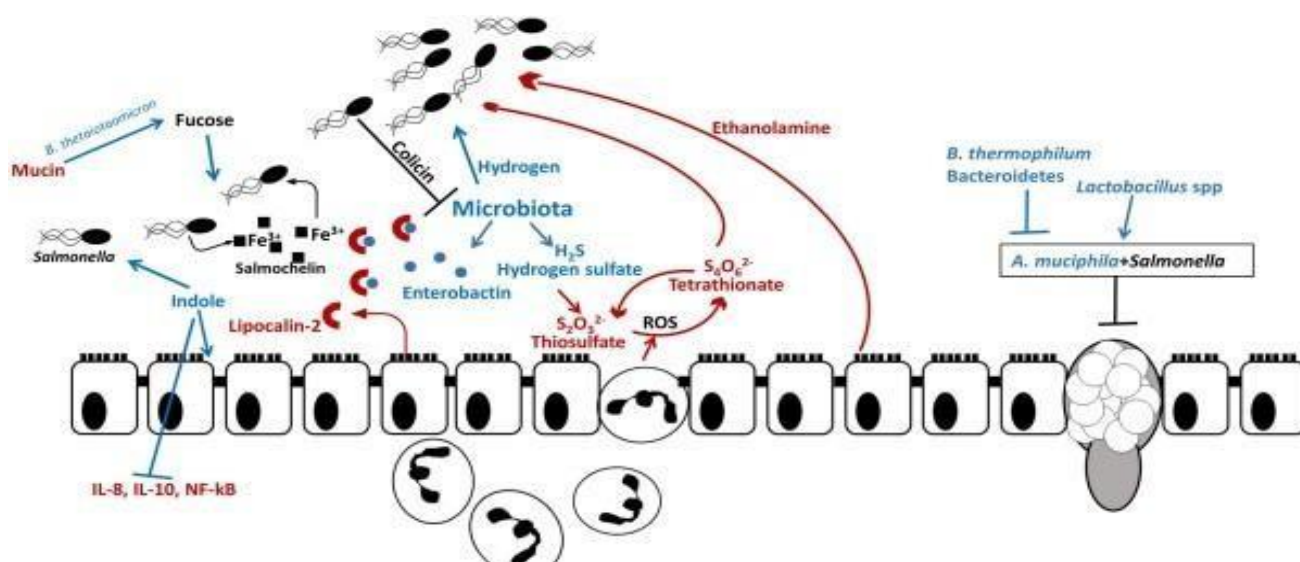


Figura 3. Processos metabólicos relacionados ao processo de exclusão competitiva entre bactéria do gênero *Salmonella* spp. e a microbiota residente no intestino. (Gart et al., 2016).

Sistema imune de aves comerciais

Um conjunto de respostas são desencadeadas pelo sistema imune da ave após a infecção do organismo por patógenos, como *Salmonella* spp., com a função de reconhecer e eliminar macromoléculas individuais ou agregados moleculares estruturais, mantendo a composição normal do organismo hospedeiro (Van Immerseel et al., 2002). Para que essa estabilidade ocorra, é necessário a ação de elementos celulares (células fagocíticas, dendríticas e imunocompetentes) e moleculares (Pattern-Recognition Receptors - PRRs) que são responsáveis pela identificação e diferenciação entre macromoléculas próprias e não próprias, por meio de padrões moleculares associados a patógenos (Pathogen-Associated Molecular Pattern - PAMPs) ou antígenos em pequenas porções da estrutura do patógeno, chamados de epítomos. O sistema imune pode ser dividido em duas partes: imunidade inata, que desenvolve e é ativada antes do nascimento; e imunidade adquirida ou adaptativa, que se inicia quando o hospedeiro entra em contato com invasores estranhos (Montassier, 2009).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos e pode ser caracterizado pela sua duração mais prolongada, porém há menor eficiência na destruição e eliminação dos patógenos e não apresenta antígeno-especificidade, nem memória (Montassier, 2009). É representado por barreiras: físicas e mecânicas, como mucosas ou fluídos corporais, que impedem ou retardam a entrada de moléculas e agentes infecciosos; fisiológicas, como temperatura corporal, acidez do trato gastrointestinal, lisozimas, interferon e sistema complemento, que eliminam ou inibem o crescimento de microrganismos por meio de rompimento de paredes celulares ou mediadores químicos; celulares, como linfócitos natural killer (NK) e leucócitos fagocíticos (neutrófilos, monócitos e macrófagos), que endocitam ou fagocitam as partículas e microrganismos estranhos; e inflamatórias, que reduzem as infecções específicas no tecido danificado, mediante a indução de células fagocitárias (Montassier, 2009).

O sistema imune adaptativo tem como atribuição reconhecimento, especificidade e memória, permitindo uma resposta mais rápida e maior em intensidade e efetividade quando um animal é apresentado uma segunda vez ao mesmo patógeno. Pode ser dividida em dois tipos: imunidade humoral e imunidade celular ou cito-mediada. A resposta imune humoral (RIH) é mediada por anticorpos (Acs), ou seja, por moléculas presentes no sangue e nas secreções da mucosa, que são produzidas pelos linfócitos burso-associados ou linfócitos B. A resposta imune cito-mediada (RIC), ocorre por intermédio direto dos linfócitos T efetores (T citotóxicos ou Tc

e T helper ou Th) ou timo-associados (Montassier, 2009). Os linfócitos T se apresentam em duas classes principais: a primeira, quando ativada para eliminar as células infectadas, se diferencia em células T CD8⁺ ou citotóxicas; a segunda, chamadas de T CD4⁺ ou auxiliares, são responsáveis pela ativação de outras células, como macrófagos, bem como na coordenação da resposta imune (Montassier, 2009).

Imunoistoquímica

Ultrapassadas as defesas iniciais, constituídas por barreiras físicas e químicas, que se contrapõem à invasão e desenvolvimento de patógenos no organismo hospedeiro, tem-se a liberação de um conjunto de respostas pelo sistema imune da ave, composto por órgãos, tecidos, células e moléculas (Van Immerseel et al., 2002). E a disponibilidade de ferramentas como a imunoistoquímica contribuem para a compreensão de como o hospedeiro responde à infecção utilizando este conjunto de respostas, que objetiva o reconhecimento e eliminação de macromoléculas individuais ou agregados moleculares estruturais.

A imunoistoquímica é uma técnica que permite a utilização de propriedades bioquímicas dos antígenos e das células do sistema imune, por meio de marcadores específicos que podem ser primários ou secundários. Por apresentar essa característica, permite a visualização da expressão de células do sistema imune e sua distribuição pelo tecido escolhido, independente de seu estado de conservação (Potts, et al., 2020). Para que ocorra uma aplicação eficiente da técnica é necessária atenção durante a realização de diversas etapas, como o pré-tratamento do tecido, visando uma melhor conservação deste e, como consequência, garantindo a visualização de anticorpos e antígenos preservados. Outra etapa envolve o bloqueio de coloração não específica do tecido, no momento da diferenciação das células alvos, as quais recebem coloração específica para destaque e posterior identificação (Magaki, et al. 2019).

Objetivos

Objetivo geral

Quantificar a população de células do sistema imune durante a infecção sistêmica de aves de linhagem comercial, desafiadas por estirpes mutantes de *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (STM), contendo deleções em genes relacionados à metabolização do tetracionato (*ttrA*) e do 1,2-propanodiol (*pduA*).

Objetivos específicos

- a) Padronizar a técnica de imunoistoquímica com intuito de analisar a população de macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em tonsila cecal, fígado, ceco e íleo de aves de linhagem comercial experimentalmente infectadas por estirpes selvagens e mutantes de SE e STM.
- b) Quantificar a população de macrófagos em tonsila cecal, fígado, ceco e íleo de aves de linhagem comercial experimentalmente infectadas por estirpes mutantes de SE e STM.
- c) Quantificar a população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em tonsila cecal, fígado, ceco e íleo de aves de linhagem comercial experimentalmente infectadas por estirpes mutantes de SE e STM.

CAPÍTULO 2 – *Salmonella enterica* serovars in absence of *ttrA* and *pduA* genes enhance the cell immune response during chick infections

Abstract

Salmonella spp. is one of the major foodborne pathogens responsible for causing great economic damage, especially to the poultry industry, and bringing consequences for public health as well. Both the pathogen survival ability in the environment during inflammation as well as their relationship with the host immune system, play a key role during infections in poultry. The objective of this study was to quantify the presence of the macrophages and T lymphocytes populations using the immunohistochemistry technique, in commercial lineages of chickens experimentally infected by wild-type and mutant strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium lacking *ttrA* and *pduA* genes. *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA \Delta pduA$ triggered a higher percentage of the stained area than the wild-type, with exception of light-laying hens. *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Typhimurium $\Delta ttrA \Delta pduA$ infections lead to a pattern, 1 and 14 dpi present a percent of the stained area more expressive than at 3 and 7 dpi. In both lineages studied, were observed prominent infiltration of macrophages in comparison with lymphocytes. Overall, animals infected by the mutant strain display a positively stained area higher than the wild-type. Deletions in both *ttrA* and *pduA* genes resulted in a more intense infiltration of macrophages and lymphocytes in the host birds, suggesting no pathogen attenuation, even in different strains of *Salmonella*.

Keywords: lymphocytes, macrophages, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, salmonellosis.

Introduction

Salmonella enterica is a foodborne pathogen that provokes losses to livestock as well as impacts directly on public health. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

(*Salmonella* Enteritidis) and Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) have been mainly associated with food infections for decades. Between 1995 and 2010, *Salmonella* Enteritidis was identified in 34,2% of all samples positive for *Salmonella* spp. (1). Besides that, Winter *et al.* (2) published a substantial study investigating tetrathionate-encoding gene role, choosing the serotype *Salmonella* Typhimurium but using mice as an experimental model. Taking this into account, deepen our knowledge of host-pathogen interaction could help to improve control and eradication measurements.

Several factors are involved in salmonellosis pathogenesis, such as the ability of the pathogen to replicate in an inflamed mucous environment, depending on nutrient acquisition and anaerobic respiration (2). However, nutrient availability does not guarantee bacterial survival in a competitive environment and densely populated by other microorganisms. Thus, the ability *Salmonella enterica* metabolizes tetrathionate by means of tetrathionate reductase to produce 1,2-propanediol as an energy source, confers a fitness advantage. This enzyme is constituted by TtrA, TtrB, and TtrC. The first subunit cited belongs to the molybdopterin (MPT) superfamily and has a FeS bounding domain that is involved in the reduction of tetrathionate into thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) (2; 3; 4).

The 1,2-propanediol is used by bacterial microcompartments (MCP). This structure is constituted by seven different proteins, among which PduA is the major component of MCP structure (5). Firstly, 1,2-propanediol is converted in propionaldehyde, which in turns is reduced to propanol and propionate by propanediol dehydratase activity. This process generates ATP by phosphorylation, an electron (1-propanol) gradient to NAD regeneration, and an intermediary (propionil-CoA) that can be used as carbon and energy source throughout methyl citrate via, being dependent of B₁₂ vitamin synthetized in an endogenous manner (6).

During the chicken infections model, the ability of *Salmonella enterica* serovars to

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

invade and survive within the intestinal epithelial cells and macrophages followed by the immune response evasion (7). In that context, the infection is a critical phase that depends on the interaction between bacterial and host cells and the bacterial ability to overcome the intestinal epithelium barriers to guarantee its colonization and replication. Nevertheless, it activates the inflammatory and immune responses (8) that leads to endocytosis and phagocytosis by epithelial and antigen-presenting cells (APCs), respectively. The antimicrobial activity of these cells triggers an innate response via macrophages and the adaptive immune response assembly relies on T CD4⁺ and T CD8⁺ activation (9).

In order to shed light on the host-pathogen interactions behind the intestinal infection by *Salmonella* in chickens, we evaluate the population of immune system cells during gut colonization and systemic infection in birds of commercial lineages challenged by wild-type mutant strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium, carrying deletions in genes related to the metabolization of tetrathionate (*ttrA*) and 1,2-propanediol (*pduA*).

Results

Experiment 1 – *Salmonella* Enteritidis challenged

The results of quantifying the presence of the immune response cells in caecal tonsils, caecum, ileum, and liver from broiler, light laying hens, and semi-heavy laying hens are shown in Tables 1, 2, and 3. We found more T CD4⁺ lymphocytes and macrophages cells infiltration from broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA \Delta pduA$ (SE $\Delta ttrA \Delta pduA$) than from broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis wild-type strain (wt-SE) or non-infected birds, in all evaluated tissues. An exception was found for T CD4⁺ lymphocytes infiltration at 3 dpi in the caecal tonsils, ileum, and liver, and for macrophages infiltration at 3 and 14 dpi in the liver from SE $\Delta ttrA \Delta pduA$ challenged broilers. The number of T CD8⁺ lymphocytes cells

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

infiltrated in a greater quantity from birds challenged with SE Δ trA Δ pduA at 1 and 7 dpi in caecum and liver, at 3 dpi in caecal tonsils, and at 14 dpi in the ileum. In contrast, wt-SE-challenged birds had high infiltration of T CD8⁺ lymphocyte cells in the ileum and caecal tonsils at 1 and 7 dpi, respectively (Tab. 1; [Supplementary Fig. S1](#)).

Table 2, and [Supplementary Figure S2](#), shows the T CD4⁺ and T CD8⁺, and macrophage infiltration found in tissues of semi-heavy laying hens. In general, there was great variation between the areas of cell infiltrates in relation to both the challenge strain and the tissues studied. Birds challenged with SE Δ trA Δ pduA showed higher areas covered by T CD4⁺ lymphocytes cells (in ileum at 1 and 14 dpi, and in liver at 7 dpi), and macrophages (in ileum at 7 dpi, and in liver at 3, 7 and 14 dpi), than in the same tissue of wt-SE-challenged birds. On the other hand, T CD8⁺ cells were found in larger amounts in caecal tonsils (at 1 and 7 dpi) and caecum (at 3 dpi) of birds challenged with wt-SE strain.

Differently observed in broiler and semi-heavy laying chicks, *Salmonella* Enteritidis Δ trA Δ pduA triggered an immune response cells area lower than the wild-type, in the challenge from light laying hens. wt-SE-challenged birds showed larger T CD4⁺ infiltration areas in caecal tonsils (at 1 and 3 dpi), caecum (at 3, 7, and 14 dpi), ileum (at 1 and 7 dpi), and liver (at 14 dpi). Similarly, challenges with SE Δ trA Δ pduA have resulted in reduced infiltration areas of both T CD8⁺ in caecal tonsils (at 1 dpi) and ileum (at 7 and 14 dpi), and macrophages in caecal tonsils and caecum (at 3 dpi), in comparison with wt-SE-challenged birds. No significant alterations of immune system cells area of T CD8⁺ in and macrophage cells were observed in the liver from both SE Δ trA Δ pduA- and wt-SE-challenged birds. The detailed results of the challenge with light-laying hens are shown in Table 3 (see [Supplementary Fig. S3](#)).

Experiment 2 – *Salmonella* Typhimurium challenged

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

The results of quantifying the presence of the immune response cells in cecal tonsils, caecum, ileum, and liver from broiler, light laying hens, and semi-heavy laying hens are shown in Tables 4, 5, and 6, respectively. Overall, broilers infected by the mutant strain display a positive marked area higher than those challenged with *Salmonella* Typhimurium wild-type strain (wt-STM) strain, on all four sampling days. Moreover, no alterations of immune response cells were observed in the uninfected control groups.

The lymphocytes T CD4⁺ areas in all tissues of broilers did reach a statistical difference at 1 dpi, with larger infiltrations for the challenge with *Salmonella* Typhimurium Δ trrA Δ pduA (STM Δ trrA Δ pduA). A significant difference between the area of the quantified immune response from STM Δ trrA Δ pduA- and wt-STM-challenged birds had been observed on the first and last sampling day: lymphocytes T CD8⁺ in the caecum and ileum (at 1 dpi), and liver (at 14 dpi); macrophages in the caecum, ileum, and liver (at 1 and 14 dpi) (Tab. 4; [Supplementary Fig. S4](#)).

The results from semi-heavy laying birds showed no statistical difference between mutant and wild-type strain challenges for lymphocytes T CD4⁺ in the caecum, and lymphocytes T CD8⁺ in cecal tonsils and ileum (Tab. 5; [Supplementary Fig. S5](#)). In general, the major concentration area of immune system cells in all tissues studied was more significative to macrophages infiltration area at 1 and 14 dpi, and lymphocytes T CD4⁺ infiltration area in the caecal tonsils and liver at 1, 7 and 14 dpi of semi-heavy laying hens challenged with STM Δ trrA Δ pduA (Tab. 5; [Supplementary Fig. S5](#)).

Table 6, and [Supplementary Figure S6](#) shows the T CD4⁺, T CD8⁺, and macrophage infiltration found in the tissues of light-laying hens. Birds challenged with STM Δ trrA Δ pduA showed major immune system cells area of lymphocytes T CD4⁺ and macrophages in caecal tonsils and caecum (at 14 dpi), and ileum (at 1 and 14 dpi) in comparison to immune response

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

cells area of the same tissues from wt-STM-challenged birds. No statistical difference for lymphocytes T CD8⁺ infiltration area had been found in the caecal tonsils, caecum, and ileum from challenged birds. In contrast to results obtained in other tissues, the liver from STM Δ ttrA Δ pduA-challenged birds had a more expressive stained area of immune response cells for lymphocytes T CD4⁺ and T CD8⁺ at all four dpi, and macrophages at 1 and 14 dpi.

Discussion

Bacteria, when exposed to anaerobic conditions, may use tetrathionate and 1,2-propanediol metabolic substrates for energy and respiration sources (10). Thus, *Salmonella* spp. has long been subject to investigations into how the deletion of genes known to be responsible for these pathways would affect their survival in the host. To the best of our knowledge, only one study investigating simultaneously tetrathionate- and propanediol-encodings genes roles was published. Our research group reported the effects of these deletions by evaluating systemic infection and fecal excretion of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in commercial lineages of chicks (11). To increase the discussion on this subject, the present results highlighted the immune cell infiltrated in different tissues of chick lineages challenged with both wild-type and mutant strains carrying deletions in *ttrA* and *pduA* genes.

Over the 2-week experiment the positively stained areas of lymphocytes and macrophages follow mostly a similar pattern, wherein at 1 and 14 dpi present a higher number of immune response cells. This can be explained by the primary contact of the hosts defense system when the pathogen invades. The previous report has shown that in chickens infected, even when *Salmonella* is not excreted at 12 dpi, the infection can become positive by cloacal swab from 13 dpi (12), explaining why immune system cells areas at 3 and 7 dpi were lower but back to an increase.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

At first glance, it would be expected that the elicited response of the host would be reduced when both *pduA* and *ttrA* were deleted since these genes play an important role in the survival during infection by *Salmonella* (2; 4; 13; 14; 15). However, our results comparing a double mutant lacking both genes showed the opposite, the mutant strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium triggered higher immune response cells than the wild types of strains. A shortest stained area could lead to a high number of colonies on the intestinal tract, corroborating a previous study, wherein *Salmonella* Enteritidis $\Delta ttrA\Delta pduA$ and *Salmonella* Typhimurium $\Delta ttrA\Delta pduA$ strains were recovered in higher number from cloacal swabs than their wild type correlated (11).

Salmonella can behave as an extracellular or an intracellular bacterium, depending on the nutrient repertoire available, and occurs as a switch between intestinal colonization and internalization into host cells (16). When the bacteria are ingested and killed by macrophages, some peptide fragments are transferred to the surface of the antigen-presenting cell, being encoded by a protein complex called major histocompatibility complex (MHC), in this case, MHC class II. This peptide-MHC II binding stimulates the lymphocytes T CD4⁺. However, if the bacteria decide to invade the host cell, entering the cytoplasm of the macrophage, the peptide connection with another type of MHC, class I, stimulates lymphocytes T CD8⁺ production (17).

Interestingly, lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺ present the same pattern of the macrophages over the course of the experiment, even representing different immune responses. Since the lymphocytes are part of the adaptive immune response and, the macrophages, are part of the innate immune response (9). In addition to this, we observed that broilers present a more expressive positive marked area than laying hens, confirmed by a previous study where broilers

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

challenged with mutant strains showed, for example, a more invasive intestinal colonization and systemic infection (11).

Our findings suggest that the immunohistochemistry approach provides interesting information about the behavior of immune response cells on multiple visceral organs of different commercial lineages during infection by *Salmonella enterica* serovars. Although the absence of co-staining tissues with CD3⁺ in this study may illustrate a limitation, since the mutant strain did not show attenuation, and ceased to represent a candidate for vaccine strain, the results obtained still substantially aiding *in vivo* analysis. Besides, it has not escaped our attention that these results should be analyzed by using a combined approach with qPCR to validate multiple variables among host-pathogen interaction.

Findings of the present study evidence that deleting both genes, even in different strains of *Salmonella*, resulted in bacteria that elicited a higher immune response cells in the host, showing that the pathogen has not been attenuated. We can consider that perhaps *Salmonella* was able to find another survival mechanism becoming even more pathogenic. The utilization of *ttr* and *pdu* operons in consonance with *cob* and *prp* operons has been shown, in the previous study, necessary for anaerobic respiration (16), leading us to believe that is not only required to delete more genes from each operon, but we also have to ponder deleting this whole set, in order to reach less pathogenic strains of *Salmonella enterica*.

Material and methods

The experiments, performed in accordance with relevant guidelines and regulations, were approved by the Ethical Committee on the Use of Animals (Process CEUA-006621/18; on May 10th, 2018), were carried out in the Avian Pathology Laboratory of the Department of

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

Pathology, Theriogenology, and One Health from the School of Agricultural and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University (FCAV/UNESP), Jaboticabal, Brazil.

Bacterial strains and mutant construction

The bacterial strains used here were stored within a cryoprotectant medium compounded by Lysogeny broth (LB; BD Difco™, USA) supplemented with 30% of glycerol (Merck, BR – H30402394 228) and storage in ultra-freezer (– 80°C) at the Avian Pathology Laboratory from FCAV/UNESP. *Salmonella* Enteritidis P125109 (accession number: AM933172) and *Salmonella* Typhimurium str. 98 (18) were induced to nalidixic acid- and spectinomycin-resistance (Nal^rSpc^r) and they provided the genetic background for constructing mutant strains by Lambda-red technique (19) with minor modifications, described in Saraiva *et al.* (11). Mutant bacterias constructed here are identified on the text as SE Δ trA Δ pduA (*Salmonella* Enteritidis Δ trA Δ pduA) and STM Δ trA Δ pduA (*Salmonella* Typhimurium Δ trA Δ pduA).

***In vivo* experiment**

Experiment 1 – *Salmonella* Enteritidis

Thirty-six one-day-old chicks from each of three different lineages (broiler, semi-heavy laying hens, and light laying hens), totaling one hundred and eight animals, were obtained from commercial hatcheries. At arrival, the bottom of transport card boxes was examined to confirm the *Salmonella*-free status of the birds (20), and the animals were housed within metallic cages inside the acclimatized room and received antibiotic-free feed and water *ad libitum*. A 24-hour light program was chosen on the first day to ensure optimal water and food ingestion, then a 12-hour light program was adopted in the first week, decreasing to 8 hours on the remaining days.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

The inoculum was prepared according to Berchieri Junior *et al.* (21). For this, the frozen cultures were inoculated in LB and incubated overnight at 37°C under 150 rpm. On the following day, the bacterial cultures were transferred into fresh media and incubated for 18 hours under the same conditions as previously. Then, 0.2 mL from the cultures containing 10^8 colony-forming units per mL (CFU/mL) were orally inoculated by metallic gavage directly into the birds' crop.

Nine groups were formed (A to I), being randomly divided according to the different lineages and strains (Table 7). At one-, three-, seven-, and 14-days post-infection (dpi), three birds per group each day, by morning, were euthanized by cervical dislocation to harvest the medial section of caecal tonsils, caecum, and ileum, and the distal section of the liver left lobe for further immunohistochemistry (IHC) analysis. For this, samples were submerged within n-Hexane p.a. (n-Hexano p.a., Synth, Brazil) previously refrigerated in liquid nitrogen. Immediately after the tissue freezing, it was transferred into a 2 mL cryotube (Corning, USA) and conditioned in liquid nitrogen. After sampling, the tissues were stored at -80°C until the process for IHC.

Experiment 2 – *Salmonella* Typhimurium

This experiment was carried out following the same characteristics mentioned above in experiment 1. Thirty-six chicks (one day old) were randomly divided into nine groups (A to I) based on their lineages and strains (Table 7).

Immunohistochemistry

Tissue section

The collected samples were transferred from -80°C to cryostat (Leica CM1860, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) at -22°C where were individually blocked in O.C.T. compound (Tissue-Tek[®], Sakura Finetek Europe B.V., Netherlands) per 30 minutes prior to 6

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

µm section using low profile disposable blades (Leica 819, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany). It is noteworthy that sections were done at -22°C, except liver sections, which were done at -15°C. Slides containing three repetitions of the sectioning of each organ per immune cell response marked were prepared, with thinning between each repetition. Using a paintbrush, the tissue section cuts were placed on histological slides pre-treated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, United Kingdom, Cat no. P4832) e silane (Sigma-Aldrich, USA. Cat no. 440574). The slides were stored at -20°C thereafter until IHC staining.

Immune cells staining

Firstly, the slides were submerged in 200 mL refrigerated acetone (Acetone P.A. – A.C.S., Synth, Brazil) and incubated at -20°C for 10 minutes. After that, the slides were transferred into a humidity chamber (EasyPath[®], Brazil) at room temperature for 5 minutes in order to dry the samples. The slides were washed thereafter with PBS and a puddle was left for 5 minutes to avoid tissue dehydration. Then, tissues were submerged in 200 mL of 4% H₂O₂ per 10 minutes in a dark place and washed again with PBS. The area around the tissue sections was dried with absorbent paper and the sample was bypassed by a hydrophobic pen (Dako Pen, Dako Denmark A/S, Denmark). The washing step leaving a puddle was repeated as previously.

The biotin-free kit Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection – Micropolymer (Abcam[®], USA) was used to stain the immune cells, choosing the Avidin-Biotin Streptavidin Peroxidase Complex (ABC) method. For this, the puddle was removed, and non-specific background color blocker reagent droplets were added to the tissues. The slides were maintained inside the humidity chamber in a dark place for 30 minutes, the washing step was repeated, and 200 µL of primary antibody (Mouse Anti-Chicken CD4-UNLB; Mouse Anti-Chicken CD8α-UNLB; Mouse Anti-Chicken Monocyte/Macrophage-UNLB, Southern

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

Biotech, USA) diluted in a proportion of 1:200 (v/v) in the antibody diluent reagent (Antibody diluent, Abcam[®], USA) was added thereafter. The slides were incubated at 4°C for 18 hours.

On the following day, the slides were washed as previously. Then, droplets of the secondary antibody (Reveal Complement, Abcam[®], USA) was added after removing the excess PBS and the humidity chamber was placed in a dark ambient for 30 minutes. Subsequently, a drop of 3,3'-diaminobenzidine (DAB Chromogen 50x, Abcam[®], USA) was diluted in 1 mL of substrate (DAB Substrate, Abcam[®], USA), which volume is enough for three slides, and added to the tissue sections. One minute later, the slides were submerged in 200 mL dH₂O for 5 minutes. After that, they were transferred to a plastic cube containing Harris hematoxylin (Êxodo Científica, Brazil) and were left for 1 minute. Posteriorly, the slides were washed for 10 minutes under running water at low pressure. The slides were submitted to the alcohol-xylene series (70% Alcohol, 90% Alcohol, 100% Alcohol, Xylene I, and Xylene II). In the end, the coverslips were placed on the slides after adding a drop of water-free mounting medium (Entellan[®], Merck, Brazil). Images from the tissue sections were taken randomly, choosing five random view fields, using an optical microscope (lens 400X) (Coleman[®], model N-120) with a digital camera adapter, for further statistical analysis.

Data analysis

The percentage of lymphocytes and macrophages were calculated by means of the software Image-Pro Plus v.4.5.0.29 (MediaCybernetics, USA). They were quantified as percentage values in accordance with the immune cell marker positive area/total area. Statistical analysis and graphics were done using the software GraphPad Prism v.8.0.1 for macOS (GraphPad Software, La Jolla California, USA) and data were submitted to Variance Analysis (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons, considering a significance level lower than 5% ($P \leq 0,05$).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

References

1. Freitas Neto, O. C., Penha Filho, R. C., Barrow, P. A. Sources of Human Non-Typhoid Salmonellosis: A Review. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 12, 1,1-11. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2010000100001> (2010).
2. Winter, S. E. *et al.* Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*. **467**, 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature09415> (2010).
3. Hinsley, A. P., & Berks, B. C. Specificity of respiratory pathways involved in the reduction of sulfur compounds by *Salmonella enterica*. *Microbiology (Reading)*. **148**, 3631-3638. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3631> (2002).
4. Thiennimitr, P. *et al.* Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **108**, 17480-17485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107857108> (2011).
5. Staib, L., & Fuchs, T. M. Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Front. Microbiol.* **6**, 1116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01116> (2015).
6. Horswill, A. R., & Escalante-Semerena, J. C. Propionate catabolism in *Salmonella* Typhimurium LT2: two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8.5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon. *J. Bacteriol.* **179**, 928-940. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.928-940.1997> (1997).
7. Soria, M. C., Soria, M. A., Bueno, D. J., & Terzolo, H. R. Comparison of 3 culture methods and PCR assays for *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* detection in poultry feed. *Poult. Sci.* 92, 1505-1515. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02926> (2013).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

8. Van Immerseel, F. *et al.* Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 355–364. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00084-2) (2002).
9. Montassier, H. J. Fisiopatologia do sistema imune in *Doenças das Aves*. (ed. Andreatti Filho, R. L. *et al.*) 467-489. (FACTA, 2020).
10. Price-Carter, M., Tingey, J., Bobik, T. A., & Roth, J. R. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J. Bacteriol.* **183**, 2463-2475. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2463-2475.2001> (2001).
11. Saraiva, M. *et al.* Deciphering the role of *ttrA* and *pduA* genes for *Salmonella enterica* serovars in a chicken infection model. *Avian Pathol.* 1–12. <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1909703> (2021).
12. Beal, R. K., Wigley, P., Powers, C., Barrow, P. A., & Smith, A. L. Cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis are associated with protection to heterologous re-challenge. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **114**, 84-93 <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.07.011> (2006).
13. Winter, S. E., & Bäumler, A. J. A breathtaking feat: to compete with the gut microbiota, *Salmonella* drives its host to provide a respiratory electron acceptor. *Gut Microbes.* **2**, 58-60. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.1.14911> (2011).
14. Rivera-Chávez, F. I. *et al.* *Salmonella* uses energy taxis to benefit from intestinal inflammation. *PLoS Pathog.* **9**, e1003267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003267> (2013).
15. Khan C. M. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the microbiota, within the challenging niche of the gastrointestinal Tract. *Int. Sch. Res. Notices.* **2014**, 1-23.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

- <https://doi.org/10.1155/2014/846049> (2014).
16. Yoo, W., Kim, D., Yoon, H., & Ryu, S. Enzyme IIA^{Ntr} regulates *Salmonella* invasion via 1,2-propanediol and propionate catabolism. *Sci Rep.* **7**, 44827. <https://doi.org/10.1038/srep44827> (2017).
 17. Salyers, A. A & Whitt, D. D. Host defenses against bacterial pathogens: Defenses of tissue and blood in *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach* (ed. Salyers, A. A & Whitt, D. D.) 16-29 (ASM Press, 1994).
 18. Barrow, P. A., Hassan, J. O., & Berchieri, A., Jr. Reduction in faecal excretion of *Salmonella* Typhimurium strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S. Typhimurium* organisms. *Epidemiol. Infect.* **104**, 413–426. <https://doi.org/10.1017/s0950268800047439> (1990).
 19. Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201632977> (2000).
 20. Zancan, F. B., Berchieri Junior, A., Fernandes, S. A., Gama, N. M. S. Q. *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds, *Braz. J. Microbiol.* **31**, 230-232. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000300016> (2000).
 21. Berchieri, A., Jr, Murphy, C. K., Marston, K., & Barrow, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol.* **30**, 221–231. <https://doi.org/10.1080/03079450120054631> (2001).

Acknowledgements

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) research grants are gratefully acknowledged. The authors wish to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel [grant number CAPES 88887.512107/2020-00 (J.M. Cabrera)], Sao Paulo Research Foundation [grant number FAPESP 2018/2130-2 (M.M.S. Saraiva) and grant number FAPESP 2018/03189-0 (A. Berchieri Junior)]. We are in debt with Prof. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão for kindly provide the use of cryostat (Leica CM1860, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany).

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

Tables

Table 1. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of broilers infected with *Salmonella* Enteritidis wild and mutant strains at different days post-infection.

Broilers		1 DPI	3 DPI	7 DPI	14 DPI
Caecal tonsils	T CD4+	Δ -SE****	wt-SE*	ns	Δ -SE****
	T CD8+	wt-SE*	Δ -SE**	ns	ns
	Macrophages	Δ -SE*	Δ -SE****	Δ -SE*	Δ -SE****
Liver	T CD4+	Δ -SE**	ns	Δ -SE****	Δ -SE***
	T CD8+	Δ -SE*	ns	Δ -SE****	ns
	Macrophages	Δ -SE****	ns	Δ -SE**	ns
Caecum	T CD4+	Δ -SE****	Δ -SE****	Δ -SE****	Δ -SE****
	T CD8+	Δ -SE****	Δ -SE****	Δ -SE****	Δ -SE****
	Macrophages	Δ -SE****	Δ -SE****	Δ -SE****	Δ -SE****
Ileum	T CD4+	Δ -SE****	ns	Δ -SE****	Δ -SE****
	T CD8+	ns	ns	wt-SE***	Δ -SE***
	Macrophages	Δ -SE****	Δ -SE****	Δ -SE***	Δ -SE****

DPI, days post-infection; Δ -SE, *Salmonella* Enteritidis Δ trA Δ pduA; wt-SE, *Salmonella* Enteritidis wild-type; ns, no significant difference. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparisons between wild and mutant strains values (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

Table 2. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of semi-heavy laying hens infected with *Salmonella* Enteritidis wild and mutant strains at different days post-infection.

Semi-heavy laying hens		1 DPI	3 DPI	7 DPI	14 DPI
Caecal tonsils	T CD4+	Δ -SE****	wt-SE***	wt-SE*	wt-SE****
	T CD8+	wt-SE****	ns	ns	Δ -SE*
	Macrophages	wt-SE**	ns	Δ -SE*	ns
Liver	T CD4+	wt-SE***	ns	Δ -SE*	wt-SE****
	T CD8+	ns	ns	Δ -SE****	Δ -SE**
	Macrophages	ns	Δ -SE****	ns	Δ -SE**
Caecum	T CD4+	ns	wt-SE**	ns	ns
	T CD8+	ns	Δ -SE*	ns	ns
	Macrophages	ns	ns	ns	wt-SE**
Ileum	T CD4+	Δ -SE****	ns	ns	Δ -SE****
	T CD8+	wt-SE*	ns	ns	ns
	Macrophages	wt-SE****	Δ -SE*	ns	ns

DPI, days post-infection; Δ -SE, *Salmonella* Enteritidis Δ trA Δ pduA; wt-SE, *Salmonella* Enteritidis wild-type; ns, no significant difference. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparisons between wild and mutant strains values (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

Table 3. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of light laying hens infected with *Salmonella* Enteritidis wild and mutant strains at different days post-infection.

Light laying hens		1 DPI	3 DPI	7 DPI	14 DPI
Caecal tonsils	T CD4+	wt-SE ^{****}	wt-SE ^{****}	ns	ns
	T CD8+	wt-SE ^{***}	ns	ns	ns
	Macrophages	ns	wt-SE ^{**}	ns	ns
Liver	T CD4+	ns	ns	ns	wt-SE [*]
	T CD8+	ns	ns	ns	ns
	Macrophages	ns	ns	ns	ns
Caecum	T CD4+	ns	wt-SE ^{****}	wt-SE [*]	ns
	T CD8+	ns	ns	Δ -SE ^{**}	ns
	Macrophages	ns	wt-SE ^{****}	ns	ns
Ileum	T CD4+	wt-SE ^{****}	ns	wt-SE ^{***}	ns
	T CD8+	ns	ns	wt-SE ^{****}	wt-SE ^{****}
	Macrophages	ns	wt-SE ^{****}	Δ -SE [*]	wt-SE ^{****}

DPI, days post-infection; Δ -SE, *Salmonella* Enteritidis Δ trA Δ pduA; wt-SE, *Salmonella* Enteritidis wild-type; ns, no significant difference. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparisons between wild and mutant strains values (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

Table 4. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of broilers infected with *Salmonella* Typhimurium wild and mutant strains at different days post-infection.

Broilers		1 DPI	3 DPI	7 DPI	14 DPI
Caecal tonsils	T CD4+	Δ -STM ^{****}	ns	Δ -STM [*]	Δ -STM ^{****}
	T CD8+	Δ -STM ^{****}	ns	Δ -STM [*]	Δ -STM ^{***}
	Macrophages	ns	Δ -STM ^{**}	Δ -STM ^{***}	ns
Liver	T CD4+	Δ -STM ^{****}	Δ -STM ^{***}	ns	ns
	T CD8+	ns	ns	Δ -STM [*]	Δ -STM [*]
	Macrophages	Δ -STM ^{***}	ns	ns	Δ -STM ^{**}
Caecum	T CD4+	Δ -STM ^{***}	ns	ns	ns
	T CD8+	Δ -STM [*]	ns	ns	ns
	Macrophages	Δ -STM ^{**}	ns	ns	Δ -STM [*]
Ileum	T CD4+	Δ -STM ^{****}	ns	Δ -STM ^{***}	Δ -STM ^{****}
	T CD8+	Δ -STM ^{****}	ns	Δ -STM ^{***}	ns
	Macrophages	Δ -STM [*]	ns	ns	Δ -STM ^{****}

DPI, days post-infection; Δ -STM, *Salmonella* Typhimurium Δ trA Δ pduA; wt-STM, *Salmonella* Typhimurium wild-type; ns, no significant difference. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparisons between wild and mutant strains values (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

Table 5. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of semi-heavy laying hens infected with *Salmonella* Typhimurium wild and mutant strains at different days post-infection.

Semi-heavy laying hens		1 DPI	3 DPI	7 DPI	14 DPI
Caecal tonsils	T CD4+	Δ -STM**	ns	Δ -STM****	Δ -STM**
	T CD8+	ns	ns	ns	ns
	Macrophages	Δ -STM**	ns	ns	Δ -STM****
Liver	T CD4+	Δ -STM****	ns	Δ -STM*	Δ -STM**
	T CD8+	ns	ns	ns	Δ -STM****
	Macrophages	Δ -STM***	ns	ns	ns
Caecum	T CD4+	ns	ns	ns	ns
	T CD8+	Δ -STM****	ns	ns	Δ -STM*
	Macrophages	ns	ns	ns	Δ -STM*
Ileum	T CD4+	Δ -STM**	ns	ns	ns
	T CD8+	ns	ns	ns	ns
	Macrophages	ns	ns	ns	Δ -STM***

DPI, days post-infection; Δ -STM, *Salmonella* Typhimurium Δ trA Δ pduA; wt-STM, *Salmonella* Typhimurium wild-type; ns, no significant difference. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparisons between wild and mutant strains values (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

Table 6. Representation of the significant difference related to the quantitative distribution of different immune response cells in visceral organs of light laying hens infected with *Salmonella* Typhimurium wild and mutant strains at different days post-infection.

Light laying hens		1 DPI	3 DPI	7 DPI	14 DPI
Caecal tonsils	T CD4+	ns	ns	ns	Δ -STM**
	T CD8+	ns	ns	ns	ns
	Macrophages	ns	ns	ns	Δ -STM****
Liver	T CD4+	Δ -STM****	Δ -STM*	Δ -STM*	Δ -STM**
	T CD8+	Δ -STM****	Δ -STM***	Δ -STM***	Δ -STM****
	Macrophages	Δ -STM*	ns	ns	Δ -STM****
Caecum	T CD4+	ns	ns	ns	Δ -STM****
	T CD8+	ns	ns	ns	ns
	Macrophages	ns	ns	ns	Δ -STM**
Ileum	T CD4+	Δ -STM**	ns	ns	Δ -STM*
	T CD8+	ns	ns	ns	ns
	Macrophages	Δ -STM***	ns	ns	Δ -STM***

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

DPI, days post-infection; Δ -STM, *Salmonella* Typhimurium Δ trA Δ pduA; wt-STM, *Salmonella* Typhimurium wild-type; ns, no significant difference. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparisons between wild and mutant strains values (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

Table 7. Established groups according to the different lineages and strains.

Group	Lineage	Strain
A	Broiler	SE Δ trA Δ pduA or STM Δ trA Δ pduA
B	Broiler	wt-SE or wt-STM
C	Semi-heavy laying hens	SE Δ trA Δ pduA or STM Δ trA Δ pduA
D	Semi-heavy laying hens	wt-SE or wt-STM
E	Light laying hens	SE Δ trA Δ pduA or STM Δ trA Δ pduA
F	Light laying hens	wt-SE or wt-STM
G	Broiler	NC
H	Semi-heavy laying hens	NC
I	Light laying hens	NC

SE Δ trA Δ pduA, *Salmonella* Enteritidis Δ trA Δ pduA; STM Δ trA Δ pduA, *Salmonella* Typhimurium Δ trA Δ pduA; wt-SE, *Salmonella* Enteritidis wild-type; wt-STM, *Salmonella* Typhimurium wild-type; NC, negative control.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

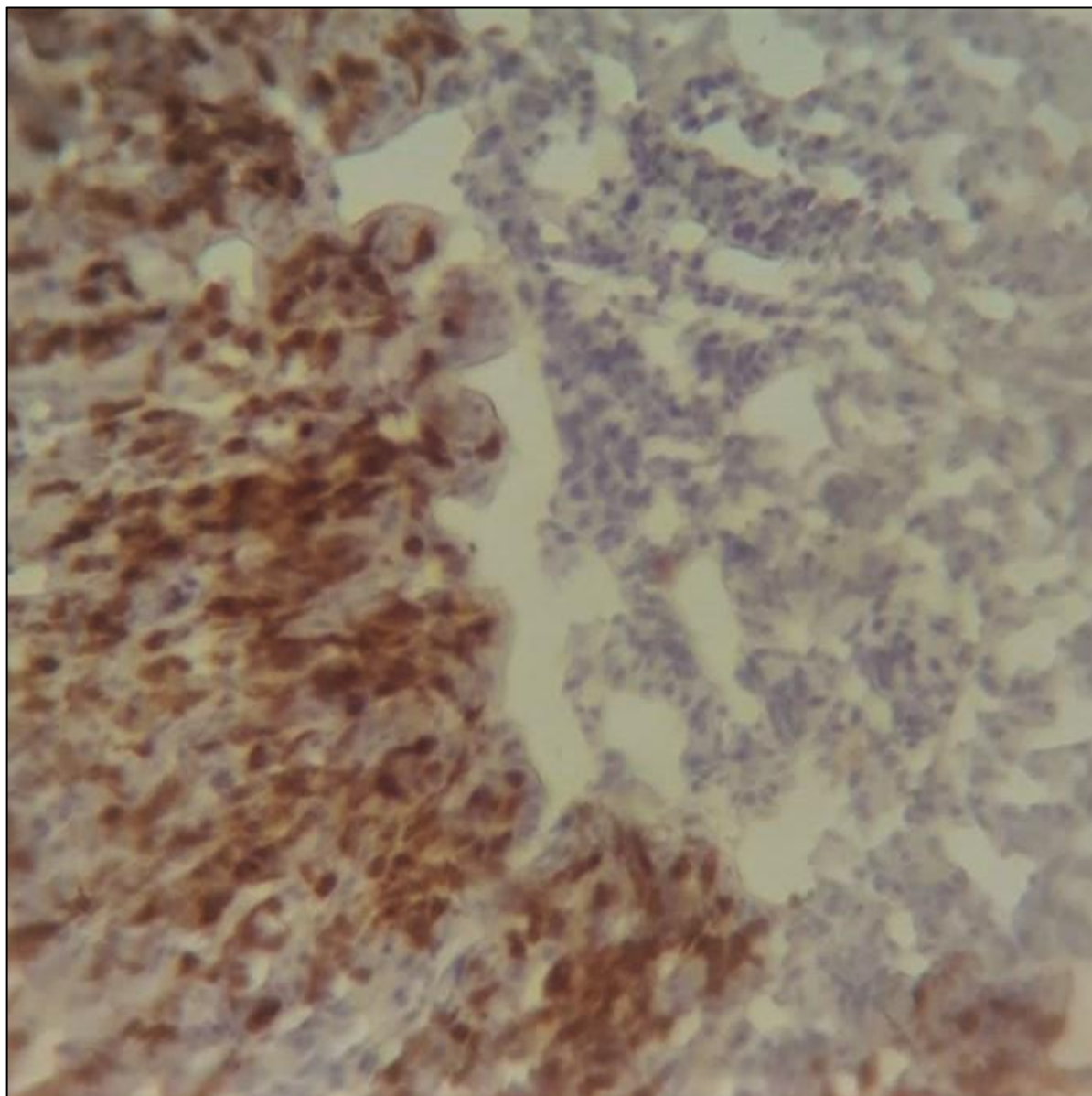
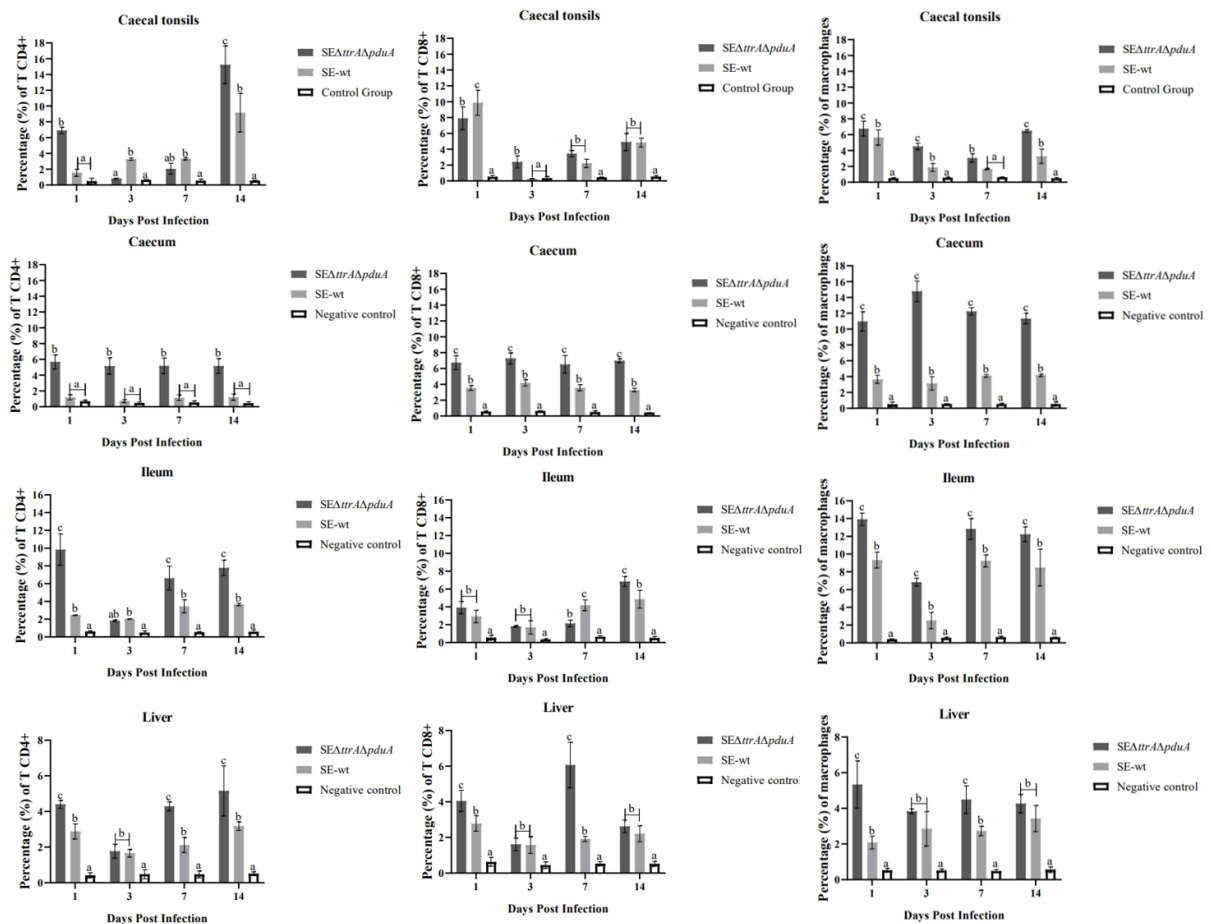
Figure

Figure 1. Section of the caecum of broiler infected by *Salmonella* Typhimurium $\Delta trA\Delta pduA$ showing immunoreactions in macrophages, 7 days post infection (x400; Avidin-Biotin Streptavidin Peroxidase, counter stained with Hematoxylin).

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

Supplementary information

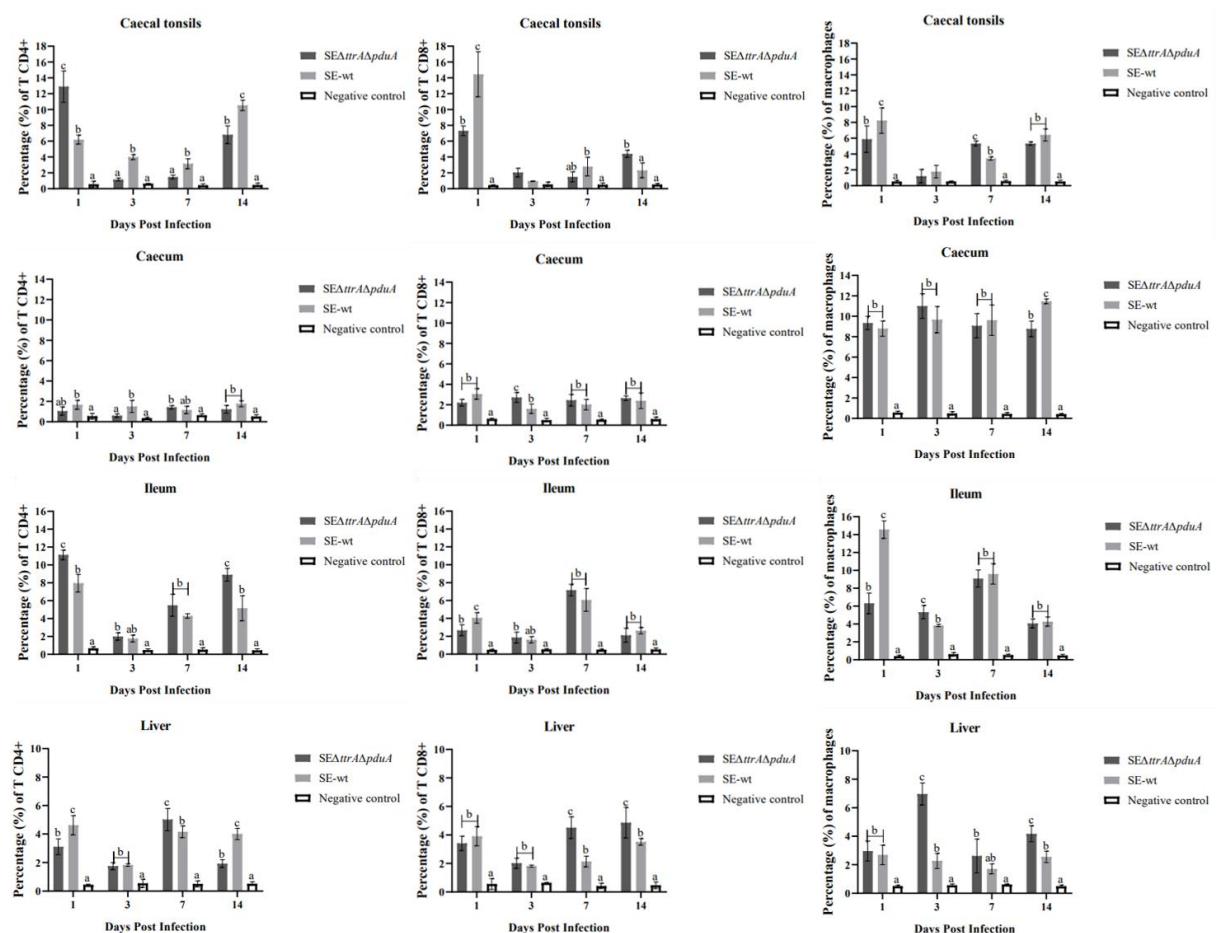
Supplementary Figure S1. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of broiler infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Enteritidis $\Delta trA\Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.



Supplementary Figure S2. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of semi-heavy laying hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Enteritidis $\Delta trA\Delta pduA$ strains

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

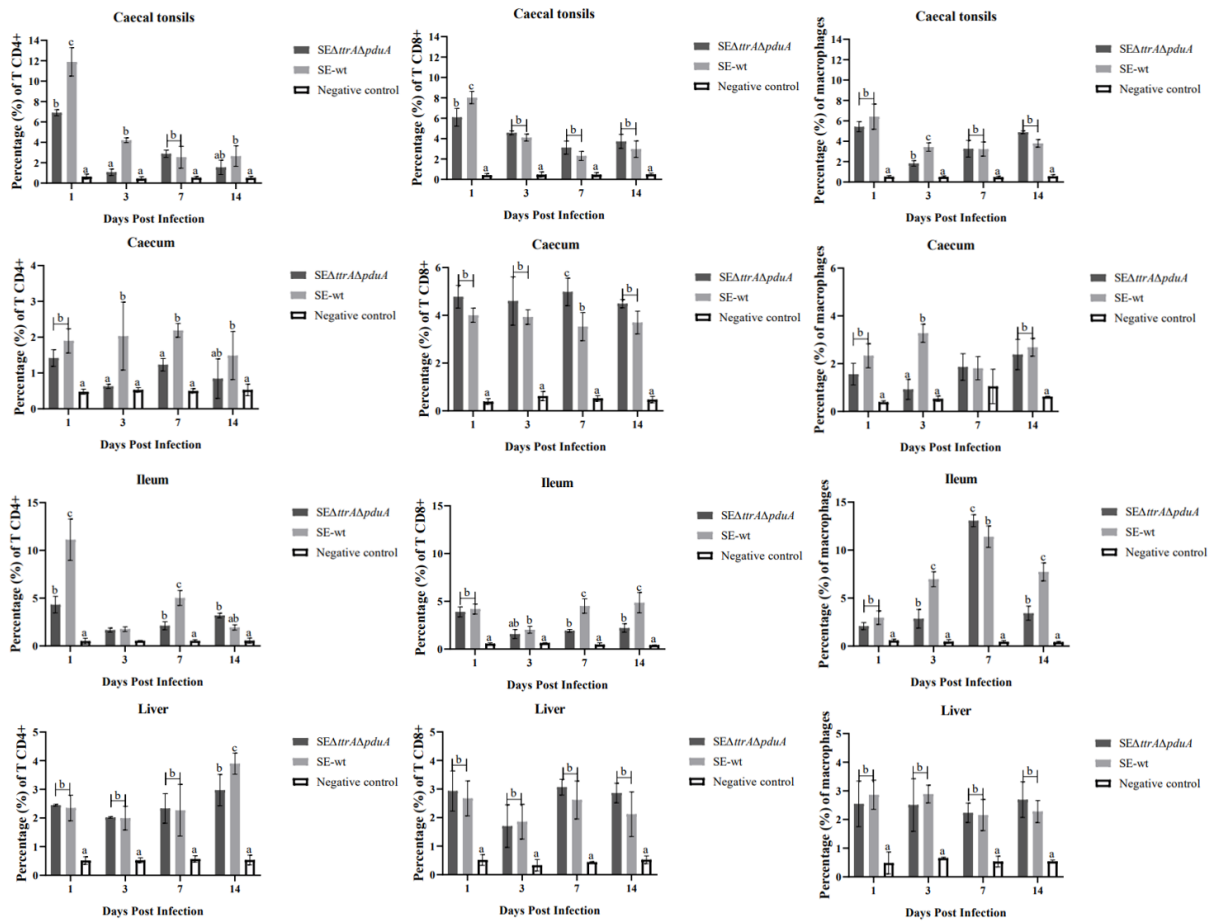
at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.



Supplementary Figure S3. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of light laying hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Enteritidis ΔtrrAΔpduA strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5%

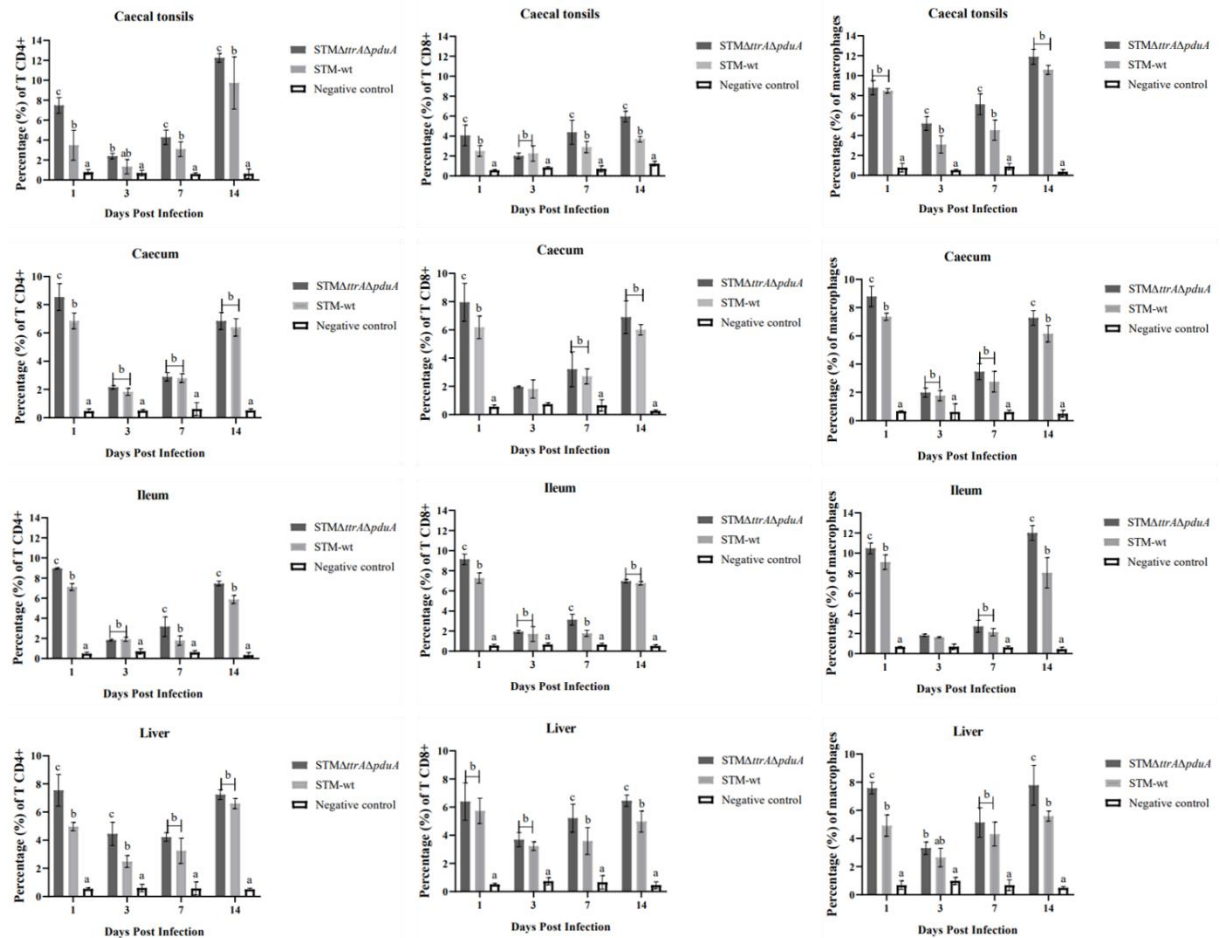
¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

probability.



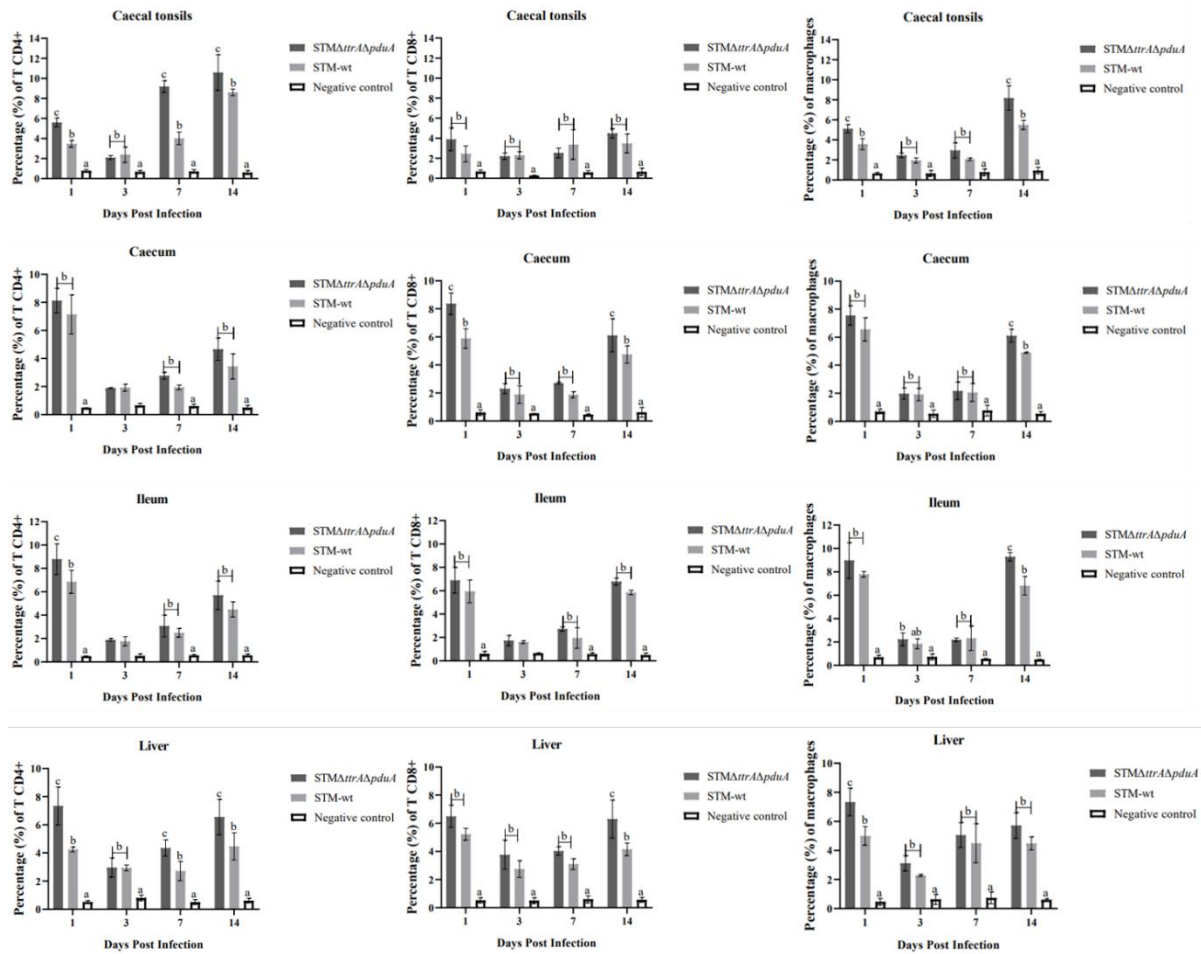
Supplementary Figure S4. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of broiler infected with *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Typhimurium $\Delta trr\Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.



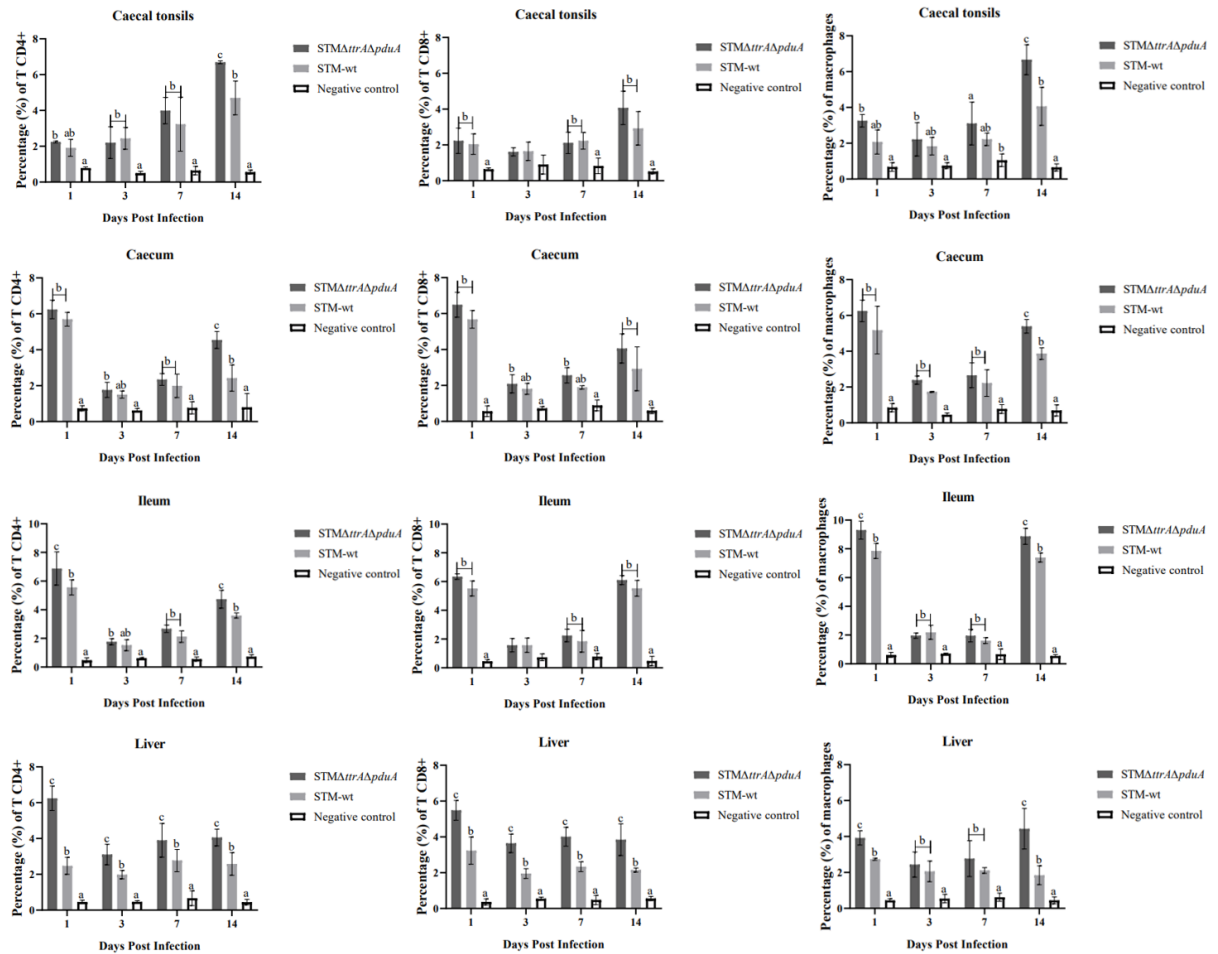
Supplementary Figure S5. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of semi-heavy laying hens infected with *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Typhimurium $\Delta trA\Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.



Supplementary Figure S6. Percentage of the stained area by populations of lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺, and macrophages in the caecal tonsils, liver, caecum, and ileum of light laying hens infected with *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Typhimurium $\Delta trA\Delta pduA$ strains at different days post-infection. Different letters mean a significant statistical difference between challenged (mutant- and wild-type) and no challenged birds, in each of the days post-inoculation (dpi), by two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test at 5% probability.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.



¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Reports e encontra-se em avaliação para publicação.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. ABPA projeta alta na produção de carne de frango e carne suína em 2020. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-projeta-alta-na-producao-de-carne-de-frango-e-de-carne-suina-em-2020/>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Relatório anual: 2016. Brasil. São Paulo, 2017.
- Badia, J.; Ros, J.; Aguilar, J. **Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella* Typhimurium and *Klebsiella pneumoniae***. J. Bacteriol 161:435–437, 1985.
- Berchieri Jr, A.; Murphy, C.K.; Marston, K.; Barrow P.A. **Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: Effect of bacterial and host genetic background**. Avian Pathology, v. 30, n. 3, p.221- 231, 2001.
- Chirullo, B.; Pesciarili, M.; Drumo, R.; Ruggeri, J.; Razzuoli, E.; Pistoia, C.; Petrucci, P.; Martinelli, N.; Cucco, L.; Moscati, L.; Amadori, M.; Magistrali C.F.; Alborali, G.L.; Pasquali, P. ***Salmonella* Typhimurium exploits inflammation to its own advantage in piglets**. Frontiers in Microbiology, v. 6, n. 985, 2016.
- Ernst, R.K.; Dombroski, K.M.; Merrick, J.M. **Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella* Typhimurium**. Infection and Immunity, v. 58, n. 6, 1990.
- EU. **European Union. RASFF - The Rapid Alert System for Food and Feed**. RASFF Portal. European Commission. Health and Food Safety 2017. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-indow/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- Denadai, J. **Infecção de aves (*Gallus gallus domesticus*) com *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis contendo deleções nos genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE*: avaliação da colonização intestinal, invasão sistêmica e resposta imune**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 111p, 2015.
- Freitas Neto, O. C., Penha Filho, R.C., Barrow, P.A. **Sources of Human Non-Typhoid Salmonellosis: A Review**. Brazilian Journal of Poultry Science. v. 12, n. 1, p.1-11, 2010.

Garsin, D.A. **Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation.** Nature Review Microbiology, v. 8, n. 4, p.290-295, 2010.

Gart, E.V.; Suchodolski, J.S.; Welsh, T.H. Jr; Alaniz, R.C.; Randel, R.D.; Lawhan, S.D. ***Salmonella* Typhimurium and multidirectional communication in the gut.** Frontiers in Microbiology, v.7, n. 1827, p.1-18, 2016.

Hinsley, A.P.; Berks, B.C. **Specificity of respiratory pathways involved in the reduction of sulfur compounds by *Salmonella enterica*.** Microbiology, v. 148, p.3631-3638, 2002.

Horswill, A. R.; Escalante-Semerena, J.C. **Propionate catabolism in *Salmonella* Typhimurium LT2: two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8.5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon.** Journal of Bacteriology, v. 179, p.928-940, 1997.

Issenhuth-Jeanjean, S.; Roggentin, P.; Mikoleit, M.; Guibourdenche, M.; Pinna, E.; Nair, S.; Fields, P.I.; Weill, F. **Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme.** Research in Microbiology, v. 165, p.526-530, 2014.

Jones, P.W.; Turner, J.M. **Interrelationships between the enzymes of ethanolamine metabolism in *Escherichia coli*.** Journal Genetic Microbiology, v. 130, n. 2, p.299-308, 1984.

Khan, C.M.A. **The Dynamic Interactions between Salmonella and the Microbiota, with in the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract.** International Scholarly Research Notices. v. 2014, p.1-23, 2014.

Ma, K.; Deng, Y.; Bai, Y.; Xu, D.; Chen, E.; Wu, H.; Li, B.; Gao, L. **Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation.** Food Control, v. 42, p.87-93, 2014.

Montassier, H. J. **Fisiopatologia do sistema imune.** In: Berchieri Junior, A.; Silva, E. N.; Fábio, J. D.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. (Eds.). Doenças das Aves. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p.391-434.

Omiccioli, E.; Amagliani, G.; Brandi, G.; Magnani, M. **A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk.** Food Microbiology, v. 26, p.615-622, 2009.

O'regan, E.; McCabe, E.; Burgess, C.; McGuinness, S.; Barry, T.; Duffy, G.; Whyte, P.; Fanning, S. **Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples.** BMC Microbiology, v. 8, p.1-11, 2008.

OIE, World Organisation for Animal Health. **Fowl typhoid and Pullorum disease**, capítulo 2.3.11. In: OIE (Ed.). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th Ed. Paris: OIE, 2012. p.538-548.

Patel, S.; McCormick, B.A. **Mucosal Inflammatory Response to *Salmonella* Typhimurium Infection.** Frontiers of Immunology, v. 5, n. 311, p.1-10, 2014.

Price-Carter, M.; Tingey, J.; Bobik, T.A.; Roth, J.R. **The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol.** Journal Bacteriology, v. 183, n. 8, p.2463-2475, 2001.

Axena, R. K.; Anand, P.; Saran, S.; Isar, J.; Agarwal, L. **Microbial production and applications of 1,2-propanediol.** Indian Journal of Microbiology, 50(1), 2–11, 2010.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Volume 51, Número 32. ago. 2020. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/17/Boletim-epidemiologico-SVS-32.pdf> Acesso em: 26 nov. 2020.

Soria, M.C.; Soria, M.A.; Bueno, D.J.; Terzolo, H.R. **Comparison of 3 culture methods and PCR assays for *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum detection in poultry feed.** Poultry Science, v. 92, p.1505-1515, 2013.

Staib, L.; Fuchs, T.M. **Regulation of fucose and 1,2-propanediol by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.** Frontiers in Microbiology, v. 6, n. 1116, 2015.

Thiennimitr, P.; Winter, S.E.; Winter, M.G.; Xavier, M.N.; Tolstikov, V.; Hoseby, D.L.; Sterzenbach, T.; Tsolis, R.M.; Roth, J.R.; Baumler, A.J. **Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota.** PNAS. v. 108, n. 42, 2011.

Van Immerseel, F.; De Buck, J.; De Smet, I.; Mast, J.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. **Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain.** Developmental & Comparative Immunology, 26(4), 355–364, 2002.

Potts EM, Coppotelli G, Ross JM. **Histological-Based Stainings using Free-Floating Tissue Sections.** J Vis Exp. 2020;(162):10.3791/61622.

Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. **An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry.** Methods Mol Biol. 2019;1897:289-298.

Winter, S.E.; Thiennimitr, P.; Winter, M.G.; Butler, B.P.; Huseby D.L.; Crawford, R.W.; Russell, J. M.; Bevins, C.L.; Adams, L.G.; Tsois, R.M.; Roth, J.R.; Baumler, A.J. **Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*.** Nature, v. 467, p.426-429, 2010.

Winter, S.E.; Baumler, A.J. **A breath-taking feat: to compete with the gut microbiota, *Salmonella* drives its host to provide a respiratory electron acceptor.** Gut microbes, v. 2, n. 1, p.57- 60, 2011.

Zancan, F.B.; Berchieri Junior, A.; Fernandes, S.A.; Gama, N.M.S. Q. ***Salmonella* spp. investigation in transport box of day-old birds.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 31, n. 3, p.230-232, 2000.